



# Impact du dinoflagellé toxique, *Alexandrium minutum*, sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : approche intégrative

Hansy Haberkorn

## ► To cite this version:

Hansy Haberkorn. Impact du dinoflagellé toxique, *Alexandrium minutum*, sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : approche intégrative. Interactions entre organismes. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2009. Français. NNT: . tel-00471896v2

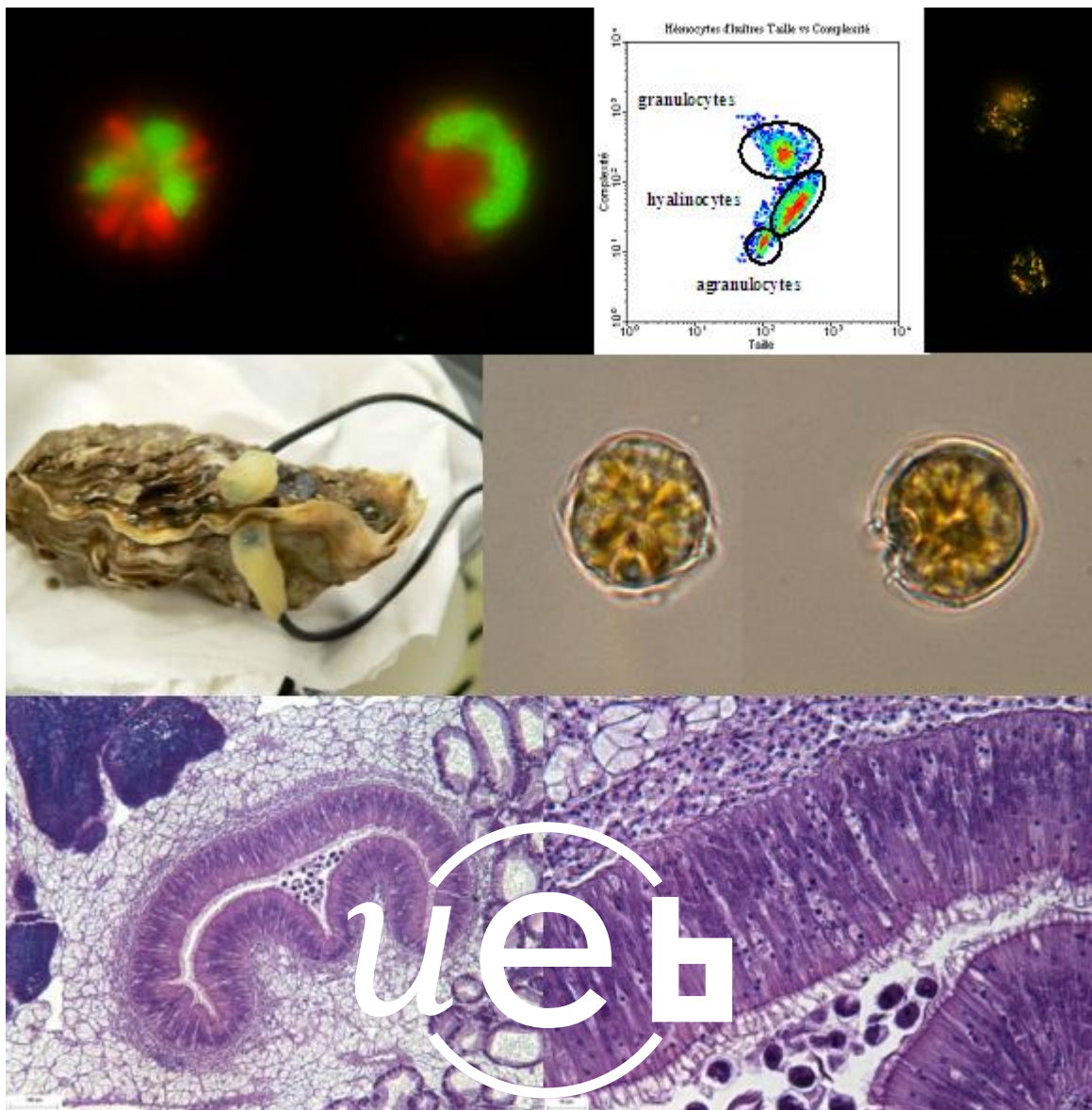
**HAL Id: tel-00471896**

**<https://theses.hal.science/tel-00471896v2>**

Submitted on 28 Apr 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE / UNIVERSITE DE BREST**  
 sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne  
 pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BREST**  
 Mention : Océanologie biologique  
 Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

**Hansy HABERKORN**

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche (n°6539)  
 Institut Universitaire Européen de la Mer  
 Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin

# Impact du dinoflagellé toxique, *Alexandrium minutum*, sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : approche intégrative

Thèse soutenue le (15/12/2009)  
 devant le jury composé de :

**Jacques CLAVIER**  
 Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *président*

**Jean-Marc LEBEL**  
 Professeur, Université de Caen / *rapporteur*

**Gary WIKFORS**  
 Directeur de recherche, NOAA (Etats-Unis) / *rapporteur*

**Laure GUILLOU**  
 Chargée de recherche CNRS, HDR, Station Biologique de Roscoff / *examinateur*

**Fabrice PERNET**  
 Cadre Recherche, IFREMER LER/LR / *examinateur*

**Philippe SOUDANT**  
 Chargée de recherche CNRS, HDR Université de Bretagne Occidentale  
 Directeur de thèse

Membre invité  
**Christophe LAMBERT**  
 Chargé de recherche, Co-directeur de thèse





**Impact du dinoflagellé toxique,  
*Alexandrium minutum*,  
sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas* :  
approche intégrative**

**Hansy HABERKORN  
15 décembre 2009  
Océanologie Biologique**





# Remerciements

*Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de cette thèse.*

*Je souhaite tout d'abord remercier les financeurs de ce projet de thèse, la Région Bretagne ainsi que l'Agence Nationale de la Recherche.*

*Je tiens à remercier Jean-Marc Lebel et Gary Wikfors pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je tiens également à remercier le président du jury, Jacques Clavier, ainsi que les autres membres du jury, Laure Guillou et Fabrice Pernet.*

*Je remercie Laurent Memery pour m'avoir accueilli au sein du LEMAR.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Philippe Soudant et Christophe Lambert, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour ni atteint son terme. Merci pour les discussions scientifiques ou autres, les échanges de points de vue, la bonne ambiance des manips, pour le temps passé à écouter mes râleries, pour avoir supporté mon caractère ... comment dire ... pas toujours facile ?!, pour votre gentillesse, votre disponibilité, ... (allez, j'arrête, je sens que vous commencez à vous sentir à l'étroit dans vos chaussures...)*

*Je souhaite également remercier ...*

*Nelly Le Goïc (avec un tréma SVP !) pour ta gentillesse, ta disponibilité, tes petits coups de pouce et tes gros coups de main, merci pour les fous-rires, les séances de psychanalyse, les potins, ... et tout le reste ! Ce fut un réel plaisir d'avoir été ta copine.*

*Marie(heu)-Agnès Travers, pour tout ce qu'on a partagé, tes supers-protos, tes conseils, les séances râleries, ...*

*Marcel Koken, pour ta disponibilité et ton côté papillon, ton imagination et, une fois de plus, les séances de râleries (décidement, on va finir par croire que je râle tout le temps...)*

*Martial Huet pour avoir apprécié (à leur juste valeur !) mes blagues ...euh...obscurées?! en l'exprimant de façon... sonore !*

*La dream-team du labo, Aurélie Lelong, Caroline Fabioux, Marie Le Jean, Fanny Jeffroy, Adeline Toffin, Fabienne Legrand, Morgane Lejart, Ludovic Donaghy, Beatriz Bekker, pour les discussions pause café, les conseils avisés, les coups de pouce, ...*

*Yann Patry, Nicholas Stephens et Élodie « Élo » Nicolau mes colloc' du LEMAR, ainsi que les autres thésards ou post-doc de ce même labo (ou autre), Johann Bown, Antoine Carlier, Mathieu Gonnet, Céline Poulain, ...*

*Les stagiaires que j'ai pu torturer, Sébastien Chouinard, Gaëlle Thomas et Aurélie Lelong (encore toi !)*

*Morgane Legall pour ton énorme participation à la réalisation des manip et au traitement des échantillons. Sans toi, il m'en resterait encore à faire !*

*Fred Jean, pour m'avoir permis d'effectuer quelques heures de cours et m'avoir épaulé dans mes déboires administratifs. ...*

*Et bien sûr, toute l'équipe du LEMAR, collègues de l'UBO, et/ou d'autres labo, Alain Marhic, Alain « Raoul » Le Mercier, Anne Donval, Denis De La Broise, Robert « Bob » Marc, Christian Tartu, Louis Quiniou, Jacques Baron, Michel Auffret, Geneviève Cohat, Annick Toulemont, Anne-Sophie Podeur, Edouard Kraffe, Annick Hourmant, Elena Palacios, ...*

*Et également ...*

*Hélène Hégaret, qui est l'initiatrice de la problématique micro-algues toxiques au LEMAR, Merci pour toutes les discussions, conseils, corrections et autres du fait de la proximité de nos sujets de recherche.*

*L'équipe d'Ifremer « de l'autre côté du grillage » Jeanne Moal, Claudie Quéré, pour leur expertise lipidique, ainsi que Marie-Pierre Crassous et Philippe Miner,*

*Dominique Marie pour ton expertise cytométrique et la séance de tri des p'tites bêtes,*

*Isabelle Queau, Luc Lebrun, pour la fourniture du T.Iso, ainsi que toute l'équipe d'Argenton : René Robert, Marc Suquet, Stephane Pourveau, ...*

*Toute l'équipe du labo Phyc, Patrick Lassus, Marielle Guéguen, Catherine Belin, Claire Le Baut-Marcaillou, Michèle Bardouil, Philippe Truquet, Zouher Amzil, Véronique Savar, Florence Royer,*

*Christine Le Paul, pour le précieux fichier Word mis en page et sans bugs !!! qui facilite énormément la phase de rédaction,*

*Gary Wikfors, pour les avis et corrections des publications, ton accueil aux États-Unis, tes points de vue, et plein de choses encore. ...*

*David Veilleux pour ton accueil chaleureux lors de mon séjour aux États-Unis, mais également toute l'équipe du Milford Laboratory, Jennifer Alix, Marc Dixon, Yaquin « Judy » Li, Diane Rusanowsky, ...*

*Monica Bricelj pour tes conseils lorsque j'ai débuté dans la culture de micro-algues toxiques,*

*Inke Sunila, pour m'avoir appris ce que je sais (du moins ce que mon cerveau de little frensh boy a bien voulu retenir) de l'histo-pathologie des bivalves,*

*Goulwen de Kermoyan, pour avoir partagé une partie de mon séjour au États-Unis,*

*Aimé Langlade et Édouard Bédier, pour la fourniture de ces, Ô combien précieuses, huîtres,*

*La team-valvo d'Arcachon : Jean-Charles Massabuau, Damien Tran et Pierre Ciret,*

*Yanyis Wessels pour tes conseils avisés, prodigués au cours du Nouveau Chapitre de la Thèse (ou NCT pour les intimes),*

*Geneviève Arzul et Françoise Quiniou les « mamans » d'Ifremer,*

*Nathalie Simon et Christophe Six pour la super semaine de formation phytoplactonique,*

*Jean-Pierre Carval pour m'avoir permis d'effectuer un stage dans une écloserie de coquilles St-Jacques, ainsi que Marie-Louise Nédélec pour m'avoir initié à l'aquaculture de bivalves et à la culture de phytoplancton, ce qui m'a été fort utile durant ma thèse,*

*Patrick Le Chevalier qui m'a fait découvrir et apprécier le monde fascinant du milieu marin et des bivalves, et qui est à l'origine de cette aventure. Merci également à Morgane Nédélec et Pierre Mollo qui ont eux aussi participé au commencement de ce périple,*

*Marc Bigot, pour m'avoir aidé et soutenu lors de mes premiers pas dans le monde des bivalves,*

*Et tous ceux que j'ai oubliés...*

*Je souhaite bien entendu remercier toute ma famille et mes amis pour leur soutien, mes beaux-parents, beaux-frères et belles-sœurs, tantes, oncles, cousines, cousins, ...*

*Et, bien évidemment, mes plus sincères remerciements vont également à celle qui a choisi de partager ma vie, ma moitié, mon amour, Sab, merci d'avoir été ma source d'inspiration, de m'avoir ouvert les yeux, merci de m'avoir supporté et supporté ... , merci pour ton soutien, tes encouragements, ta patience, les lectures, re-lectures et re-re-lectures, et tout le reste... sans toi je ne serais jamais parvenu aussi loin.*

*Enfin, je remercie du fond du cœur mes parents pour avoir toujours été présents durant ce long parcours, pour m'avoir soutenu et encouragé, pour avoir cru en moi, merci pour tout et plus encore ! Ce que j'ai fait, je l'ai fait pour moi, mais également pour vous et je n'y serais jamais arrivé sans vous. Je vous aime !*



# Sommaire

<b>Introduction générale et objectifs de l'étude .....</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre 1 – Contexte scientifique .....</b>	<b>21</b>
<b>1. Micro-algues nuisibles et toxiques.....</b>	<b>23</b>
1.1. Micro-algues nuisibles.....	23
1.1.1. Effets indirects .....	23
1.1.2. Effets directs .....	24
1.2. Micro-algues toxiques .....	24
1.2.1. Exposition humaine.....	24
1.2.2. Exposition des organismes .....	29
<b>2. Impact des micro-algues toxiques sur la biologie et la physiologie des bivalves ....</b>	<b>31</b>
2.1. Activité valvaire .....	31
2.2. Nutrition .....	32
2.3. Accumulation, bio-transformation et dépuration des PSTs.....	32
2.4. Système digestif.....	33
2.5. Système immunitaire.....	34
2.6. Reproduction et recrutement .....	35
<b>3. Le modèle d'étude : <i>Alexandrium minutum</i> – <i>Crassostrea gigas</i> .....</b>	<b>37</b>
3.1. <i>Alexandrium minutum</i> .....	37
3.1.1. Les dinoflagellés .....	37
3.1.2. Le genre <i>Alexandrium</i> .....	38
3.2. L'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> .....	43
3.2.1. Biologie .....	44
3.2.2. Anatomie.....	44
3.2.3. Nutrition et système digestif .....	45
3.2.4. Reproduction.....	45
3.2.5. Muscle adducteur.....	45
3.2.6. Mécanismes de défense .....	45
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>47</b>
<b>Chapitre 2 – Matériel et méthodes .....</b>	<b>49</b>
<b>1. Condition physiologique d'<i>A. minutum</i> .....</b>	<b>51</b>
1.1. Cultures de micro-algues .....	51
1.2. Procédures d'exposition d' <i>A. minutum</i> .....	51
1.3. Mesure des paramètres cellulaires des micro-algues par cytométrie en flux.....	55
1.4. Analyses statistiques.....	55
<b>2. Exposition des huîtres <i>C. gigas</i> à <i>A. minutum</i> .....</b>	<b>57</b>
2.1. Matériel biologique .....	57
2.1.1. Caractéristiques des huîtres .....	57
2.1.2. Cultures de micro-algues .....	58
2.2. Procédures d'exposition des huîtres à <i>A. minutum</i> .....	58
2.2.1. Mesure de l'activité valvaire .....	58
2.2.2. Mesure des paramètres physiologiques.....	60
2.3. Paramètres mesurés .....	63
2.3.1. Dénombrement des micro-algues .....	63
2.3.2. Mesure de l'activité valvaire .....	64
2.3.3. Histologie .....	64
2.3.4. Analyses effectuées sur la glande digestive .....	64
2.3.5. Mesure des paramètres immunitaires .....	65
2.3.6. Qualité des spermatozoïdes .....	66
2.4. Analyses statistiques.....	67
<b>Chapitre 3 – Interaction <i>Alexandrium minutum</i> / <i>Crassostrea gigas</i> .....</b>	<b>69</b>
<b>1. Caractéristiques cellulaires d'<i>A. minutum</i> évaluées par cytométrie en flux .....</b>	<b>71</b>
1.1. Introduction .....	71

1.2. Article 1 – Flow cytometric measurements of cellular responses in a toxic dinoflagellate, <i>Alexandrium minutum</i> , upon exposure to thermal, chemical and mechanical stresses.....	73
1.3. Synthèse .....	83
<b>2. Impacts d'<i>A. minutum</i> sur l'activité valvaire de <i>C. gigas</i> .....</b>	<b>85</b>
2.1. Introduction .....	85
2.2. Article 2 – Behavioral responses of <i>Crassostrea gigas</i> exposed to the harmful algae <i>Alexandrium minutum</i> .....	87
2.3. Article 3 – Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> , exposed to <i>Alexandrium minutum</i> .....	95
2.4. Synthèse .....	103
<b>3. Impacts d'<i>A. minutum</i> sur la physiologie de <i>C. gigas</i> .....</b>	<b>105</b>
3.1. Introduction .....	105
3.2. Article 4 – Effects of <i>Alexandrium minutum</i> exposure on physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, <i>Crassostrea gigas</i> . ....	107
3.3. Article 5 – Effects of <i>Alexandrium minutum</i> exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters <i>Crassostrea gigas</i> . ....	121
3.4. Synthèse .....	135
<b>Chapitre 4 – Synthèse générale .....</b>	<b>137</b>
1. Importance de l'état physiologique d' <i>A. minutum</i> dans les interactions.....	139
2. Implication de l'état physiologique de l'huître dans l'accumulation de PSTs .....	141
3. Réponses biologiques et physiologiques de <i>C. gigas</i> à l'exposition à <i>A. minutum</i> .....	143
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>147</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>149</b>
<b>Glossaire .....</b>	<b>169</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>171</b>
<b>Table des illustrations .....</b>	<b>173</b>



# Résumé

Les effets de la micro-algue toxique, *Alexandrium minutum*, sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été analysés par une approche intégrative. Cette démarche a conduit à s'intéresser à différents aspects de la physiologie de l'huître, tels que le comportement, l'activité digestive, des activités cellulaires et la reproduction.

Dans un premier temps, le statut physiologique de *A. minutum* a été abordé en utilisant la cytométrie en flux, la microscopie ainsi que des marqueurs fluorescents. Cela nous a permis de démontrer que certaines conditions expérimentales étaient susceptibles de perturber la physiologie de ce dinoflagellé. Les systèmes expérimentaux permettant d'exposer les huîtres ont donc été conçus afin de limiter les conditions stressantes pour la micro-algue toxique.

Dans un second temps, les huîtres ont été exposées à *A. minutum*, en milieu contrôlé, au cours de plusieurs expérimentations, et comparées à des huîtres témoins nourries avec *Isochrysis galbana* ou *Heterocapsa triquetra*.

L'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* provoque chez les huîtres une réponse comportementale, se traduisant notamment par une augmentation du temps d'ouverture et de la fréquence des micro-fermetures des valves. Une corrélation positive entre le temps d'ouverture des valves et la quantité de toxines accumulées par les huîtres a été observée. De même, des pathologies du muscle adducteur des huîtres ont été constatées, ce qui pourrait expliquer les changements de comportement des huîtres.

Le dinoflagellé toxique induit une activation des mécanismes de défense des huîtres. Ainsi, une augmentation de la production de mucus a été observée au niveau des branchies, de même qu'une importante réaction inflammatoire dans la glande digestive. Les paramètres hémocytaires ont également présenté des variations. Des différences, en terme d'activité de la phénoloxydase et de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les hémocytes, ont été observées entre les huîtres exposées à *A. minutum* et les témoins. Les variations des paramètres hémocytaires semblent liées au stade de maturité des huîtres et à la quantité de toxines accumulées, mais aussi à leur statut métabolique lors de l'exposition.

Les contenus de la glande digestive en lipides sont également modifiés suite à l'exposition à *A. minutum*. Une réduction significative des contenus en monoglycérides (MG) et diglycérides (DG) ainsi qu'une importante diminution du contenu en phosphatidylcholine (PC) ont été observés. La diminution de la PC étant parallèle à celle des MG et DG, cela suggère une diminution de la synthèse des lipides liée à une altération des tissus de la glande digestive.

Finalement, les spermatozoïdes produits par les huîtres exposées à *A. minutum* présentaient une réduction de leur activité (diminution de la mobilité et du contenu en ATP) en comparaison aux huîtres témoins. Cette altération de la physiologie des gamètes pourrait avoir des répercussions sur la reproduction des huîtres.

Etant donné la subtilité de certains changements et l'interconnexion des paramètres mesurés, la mise en place d'une approche intégrative nous a permis d'obtenir une vision holistique de

l'interaction *A. minutum* / *C. gigas*. La présente étude a mis en évidence des interactions peu ou mal connues entre des caractères comportementaux, morphologiques et physiologiques des huîtres. Cela nous a conduit à mieux comprendre les interactions entre les micro-algues toxiques et les bivalves, ainsi que les impacts écologiques potentiels.

# Abstract

The effects of the toxin-producing dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, upon the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, were assessed through an integrative approach including behavior, digestion cellular activities and reproduction.

In a first time, physiological status of *A. minutum* was assessed using flow cytometry, microscopy and fluorescent dyes. This allows us to demonstrate that some experimental conditions can be stressful for this dinoflagellate. Experimental systems were adapted to minimize adverse conditions for harmful micro-algae.

In a second time, oysters were exposed under laboratory conditions to *A. minutum* in several experiments and compared to control oysters fed *Isochrysis* sp. or *Heterocapsa triquetra*.

The shell-valve behavior of *C. gigas* responded to *A. minutum* exposure with increased duration of time open and frequency of incomplete closures. Histological observations revealed myopathy in the adductor muscle (myoatrophy, wavy muscle fibers and hyaline degeneration), which is consistent with observed behavioral modifications. Furthermore, a positive correlation was observed between duration of time shell valves were open and quantity of accumulated toxins.

*A. minutum* exposure resulted in activation of defense mechanisms. Increase in mucus production in gills, as well as an inflammatory response in the digestive gland, were observed in *A. minutum*-exposed oysters. Hemocyte characteristics and functions were also changed. Significant differences, in terms of phenoloxidase activity (PO) and reactive oxygen species (ROS) production of hemocytes, were observed between *A. minutum*-exposed and control oysters. Hemocyte responses to *in vivo* *A. minutum* exposure depended upon reproductive status and toxin accumulation, but also upon metabolic activity during the experiment.

Lipid contents in the digestive gland were also affected upon *A. minutum* exposure. Significant decreases in monoacylglycerol (MAG) and diacylglycerol (DAG) contents, as well as a drastic decrease in phosphatidylcholine (PC) content in digestive glands of oysters exposed to *A. minutum* were observed. Decrease in PC along with reduction of MAG and DAG is thought to be related to a decrease in lipid synthesis because of tissue alterations in the digestive gland.

Finally, male oysters exposed to *A. minutum* produced less-active spermatozoa (lower motility and ATP content) compared to control oysters. This reduction in gamete metabolism may have implications in term of reproduction success.

As observed changes were sometimes subtle, and all measured variables were interconnected, the integrative approach allowed a holistic vision of interactions between this harmful-algal species and the Pacific oyster. This study revealed previously unknown interactions between behavioral, morphological, and physiological characteristics of oysters, thereby allowing a better understanding of the interaction between HABs and bivalves, and the potential ecological consequences.



## Avant-propos

La France est le premier producteur d'huîtres creuse, *Crassostrea gigas*, en Europe. Cette espèce de bivalve est régulièrement contaminée par des toxines, produites notamment par le dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum*. Ces contaminations ont un impact économique important sur la conchyliculture, ce qui a conduit au financement de programmes de recherche sur cette problématique.

Un financement de thèse a été accordé par la Région Bretagne pour mener un projet concernant les interactions entre le phytoplancton toxique et les bivalves (Effets des efflorescences du PHYtoplancton TOXique sur la biologie des bivalves – EPHYTOX).

La majeure partie des travaux de thèse présentés dans ce document a été réalisée dans le cadre du projet MODECOPHY (MODELisation des mécanismes de contamination des COquillages par des PHYcotoxines – 06SEST23), financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Ce projet avait pour objectif de comprendre et de modéliser les mécanismes de contamination, par des toxines algales, des coquillages commerciaux présents sur les côtes françaises.

La thèse (2006-2009) a été effectuée sous la direction de Philippe Soudant et Christophe Lambert au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR – UMR6539). Ce laboratoire rassemble de nombreuses disciplines en lien avec le milieu marin. Les problématiques liées aux micro-algues toxiques ont fait l'objet d'un développement relativement récent dans les thématiques de ce laboratoire.



---

# Introduction générale et objectifs de l'étude

---

Une grande partie de la population mondiale dépend directement des ressources aquatiques pour sa survie. La fragilité de la ressource naturelle ainsi que les besoins croissants en nourriture ont abouti au développement important de l'aquaculture. Cette activité, qui est en pleine expansion (FAO, 2000), représente un secteur économique important au niveau mondial : ainsi, en 2004, la production aquacole a atteint 59,4 millions de tonnes (Mt) pour une valeur de 70,3 milliards de dollars (Mds\$) (FAO, 2006). Parmi les organismes cultivés en aquaculture, les mollusques arrivent en troisième position de la production, en termes de quantité (22,3%) ou de valeur (14,2%). L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, représente une part importante de la production de bivalves en aquaculture.

En 2007, la production mondiale d'huîtres creuses a atteint un peu plus de 4,2 Mt (3 Mds\$). À titre de comparaison, la production totale d'huîtres a atteint 4,4 Mt (3,2 Mds\$), celle de moules 1,6 Mt (1,6 Mds\$) et celle de pectinidés 1,5 Mt (2,4 Mds\$). La même année, la production européenne d'huîtres creuses représentait 2,9% de la production mondiale (123 000 t pour 396 M\$), dont 90,3% issus de la production française (110 800 t, 355 M\$).

Cette production repose sur la ressource trophique des huîtres : en milieu naturel, les bivalves se nourrissent essentiellement de micro-algues (ou phytoplancton). En effet, les micro-algues constituent un des premiers maillons des réseaux trophiques aquatiques. Ce sont des producteurs primaires qui, en métabolisant le dioxyde de carbone atmosphérique pour en fabriquer de la matière organique, jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes : ils soutiennent le développement des maillons trophiques supérieurs. Bien que les micro-algues soient essentielles à la survie de nombreux organismes aquatiques, elles peuvent dans certains cas avoir des impacts négatifs sur les écosystèmes.

En effets, certaines espèces de micro-algues peuvent se multiplier de façon importante et atteindre des concentrations très élevées au cours d'évènements appelés efflorescences (ou blooms). Parmi ces espèces, certaines d'entre elles peuvent produire des molécules toxiques, appelées toxines ou encore phycotoxines. Lorsque les bivalves se nourrissent de ces micro-algues toxiques, ils peuvent accumuler des toxines dans leurs tissus. Or, certaines de ces toxines peuvent poser des problèmes de santé humaine, ce qui rend les coquillages impropres à la consommation. Les bivalves contaminés sont donc exclus de la vente, ce qui peut avoir des impacts socio-économiques importants.

Les effets des phycotoxines ont été largement étudiés en terme de santé publique. Les recherches et les financements se sont focalisés sur l'identification et la quantification des toxines, mais aussi sur les mécanismes d'accumulation et d'élimination de ces toxines par les bivalves. Par contre, les effets de ces toxines et plus généralement du phytoplancton toxique, sur les organismes marins ont été beaucoup moins étudiés.



Or, les micro-algues toxiques peuvent aussi avoir des effets négatifs sur les organismes aquatiques et à plus large échelle, sur les écosystèmes (Shumway, 1990 ; Burkholder, 1998 ; Landsberg, 2002). Cela peut se répercuter sur l'économie des pêches et sur l'aquaculture (Anderson et al., 2000 ; Hoagland et al., 2002 ; Hoagland and Scatasta, 2006).

Afin d'étudier les interactions entre une micro-algue toxique et un bivalve, nous avons choisi de travailler sur l'une des espèces phares de l'aquaculture, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. En France, elle est régulièrement contaminée par des toxines produites par des micro-algues appartenant au genre *Alexandrium*, dont l'une des plus observées est *A. minutum*, qui est le second organisme de notre modèle d'étude.

Si la littérature scientifique est plutôt fournie sur l'étude de la micro-algue seule ou de l'huître, les études des interactions entre ces deux espèces ont essentiellement porté sur les cinétiques et les mécanismes d'accumulation de toxines (PSTs), de bio-transformation et de dépuration (Lassus et al., 2004, 2005 ; Guéguen et al., 2008). À notre connaissance et à ce jour, aucune étude complète et intégrative allant des réponses de l'animal entier jusqu'aux réponses cellulaires n'a été menée sur les interactions entre *A. minutum* et *C. gigas*. Au-delà des implications socio-économiques évidentes de cette étude, l'approche proposée a d'abord vocation à consolider et développer les connaissances fondamentales et la compréhension des interactions micro-algues toxiques / bivalves et leurs conséquences en termes écologiques et écosystémiques.

Le but de ce travail de thèse est de caractériser les interactions entre *A. minutum* et *C. gigas* par une approche intégrative, en étudiant les effets d'*Alexandrium* à différents niveaux de la biologie du modèle.

Le premier objectif du présent travail était de développer des indicateurs permettant d'appréhender la condition physiologique du modèle phytoplanctonique choisi, *A. minutum*, avant de l'utiliser de façon optimale dans des expérimentations d'interactions avec les huîtres. L'approche mise en place ici a fait appel à des expérimentations *in vitro* utilisant la cytométrie en flux.

Le second objectif de ce travail de thèse correspondait à l'étude de l'interaction *A. minutum* / *C. gigas* en terme d'impact de la micro-algue toxique sur l'huître, mais également de l'influence de l'état physiologique de l'huître sur l'interaction. Des approches expérimentales en milieu contrôlé (laboratoire) ont donc été mises en place, au cours desquelles des huîtres *C. gigas* ont été exposées à *A. minutum*. La démarche proposée peut être qualifiée d'intégrative puisqu'elle s'intéresse aux réponses biologiques et physiologiques induites par *A. minutum* à différents niveaux :

- organisme entier
- organes
- tissus
- cellules

Le premier chapitre de ce document s'attache à décrire le contexte scientifique de ce travail de thèse. Il présente l'état des connaissances concernant les micro-algues toxiques et leurs impacts sur la santé humaine et sur les organismes marins.

Un second chapitre résume le matériel et les méthodes mis en place pour répondre aux objectifs de cette étude : tout d'abord sont présentées les expériences réalisées uniquement sur *A. minutum*, puis les expérimentations d'interactions.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenus, rédigés sous la forme de cinq publications scientifiques (voir paragraphe Valorisation en fin de document), accompagnés d'une introduction et d'une synthèse. La première partie de ce chapitre est consacrée à *A. minutum* uniquement, la seconde partie présente les résultats d'interaction *A. minutum* / *C. gigas* sur le comportement valvaire des huîtres, et la troisième partie présente les résultats d'interaction sur les réponses physiologiques des huîtres.

Le quatrième et dernier chapitre propose une synthèse générale des connaissances apportées par ce travail de thèse, ainsi que les conclusions et perspectives qui en découlent.

Le Nouveau Chapitre de la Thèse, réalisé dans le cadre d'une formation proposée par l'association Bernard Grégory, est présenté en annexe de ce document. L'exercice consistait à établir un inventaire et une mise en valeur des compétences nécessaires et acquises au cours de la thèse. Le but était de faire une analyse critique de la manière dont la thèse a été conduite, de sa gestion en tant que projet, et d'en tirer des conclusions quant aux qualités personnelles et aux savoir-faire développés.



---

## **Chapitre 1 – Contexte scientifique**

---



# 1. Micro-algues nuisibles et toxiques

Les micro-algues (ou phytoplancton - du grec *phuton*, plante, végétal et *plagktos*, errant) sont des organismes unicellulaires photosynthétiques, de taille microscopique. Elles peuvent être procaryotes ou eucaryotes et vivent en suspension dans l'eau. Ces organismes planctoniques sont soumis aux mouvements des masses d'eau.

Pour des raisons encore mal comprises, des proliférations importantes de phytoplancton ont lieu dans le milieu marin, essentiellement au niveau des zones côtières. Au cours de ces efflorescences, les concentrations cellulaires observées peuvent dépasser plusieurs millions de cellules par litre d'eau. Ces phénomènes naturels, de plus en plus fréquents, semblent être accentués par certains facteurs tels que l'eutrophisation du milieu en lien avec les activités humaines (Anderson et al., 2002 ; Maso et Garcés, 2006).

Parmi les quelques 5000 espèces estimées de micro-algues marines présentes à travers le monde, environ 2 % d'entre elles sont soupçonnées d'être nuisibles ou toxiques (Smayda, 1990 ; Hallegraeff, 1993 ; Sournia, 1995). Les effets des efflorescences de micro-algues en milieu marin (Shumway 1990 ; Landsberg, 2002) peuvent être classés en deux grandes catégories : les effets liés aux micro-algues nuisibles et les effets liés aux micro-algues toxiques.

## 1.1. Micro-algues nuisibles

### 1.1.1. Effets indirects

Les efflorescences de micro-algues peuvent avoir des effets négatifs indirects sur les organismes marins. Même lorsqu'il s'agit d'espèces de micro-algues à priori inoffensives, voire bénéfiques aux écosystèmes (base de la chaîne alimentaire), la sédimentation des cellules en fin d'efflorescence, et leur décomposition par des bactéries, peut entraîner une forte diminution de la concentration en oxygène dissout dans l'eau (Anderson et al., 2002). La formation d'une zone d'hypoxie ou d'anoxie, peut alors être fatale aux organismes vivant dans la colonne d'eau (organismes pélagiques) ou sur le fond (organismes benthiques). Généralement, la formation de ces zones pauvres en oxygène a lieu au niveau de l'interface eau-sédiment où se concentrent les cellules qui sédimentent. Ainsi en 1990, Glibert et al. (1995) ont observé que le déclin et la sédimentation d'une efflorescence printanière dans la baie de Chesapeake (Etats-Unis) avaient causé une diminution de la concentration en oxygène en dessous de la pycnocline (limite de densité entre deux masses d'eau). Plus récemment, Møller et Riisgård (2007) ont montré que la sédimentation et la décomposition des efflorescences phytoplanctoniques dans le Skive Fjord (Danemark) provoquaient de fortes diminutions des concentrations en oxygène de la couche de fond, et des mortalités dans les populations de moules (*Mytilus edulis*).

### 1.1.2. Effets directs

Les efflorescences peuvent aussi être formées par des espèces nuisibles pour les autres organismes marins, de par leurs propriétés physiques, sans pour autant que cet effet ne soit dû à la production de toxines ou de molécules toxiques. En effet, le frustule de certaines diatomées peut présenter des ornements qui peuvent abîmer les tissus fragiles de certains organismes aquatiques, tels que les branchies. Ainsi, Speare et al. (1989) ont montré que la diatomée *Chaetoceros convolutus* a provoqué de fortes mortalités (jusqu'à 60% des individus) dans des élevages de saumons (*Oncorhynchus kisutch*) en Colombie Britannique. Des lésions au niveau des branchies des poissons ont été observées, notamment une fusion des lamelles branchiales. Ces lésions auraient été provoquées par des ornements en formes d'aiguilles (photo ci-contre) présentes sur le frustule, entraînant la mort des poissons par asphyxie (Speare et al., 1989). Cette même diatomée (*C. convolutus*) a été décrite comme responsable de la mort de crabes, *Paralithoides camtschatica*, par asphyxie liée à l'altération des branchies et à une sécrétion importante de mucus (Tester et Mahoney, 1995).



## 1.2. Micro-algues toxiques

Les efflorescences peuvent être constituées par des espèces phytoplanctoniques qui produisent des molécules ayant des effets négatifs directs sur les organismes. La majorité des études sur ce sujet s'est intéressée aux toxines pouvant affecter la santé humaine.

D'une manière générale, les efflorescences de micro-algues productrices de toxines peuvent avoir des impacts socio-économiques et écologiques importants (Hoagland et al., 2002 ; Hoagland et Scatasta, 2006), soit en rendant des espèces cultivées et/ou pêchées impropres à la consommation, soit en perturbant l'équilibre des populations naturelles ou cultivées, en provoquant par exemple des mortalités ou des déficits de recrutement.

### 1.2.1. Exposition humaine

Deux principales voies d'exposition humaine ont été décrites.

#### 1.2.1.1. Exposition aérienne et/ou cutanée

La présence de cellules phytoplanctoniques productrices de toxines dans les embruns marins peut affecter les populations vivant en bordure de mer. Ainsi, Pierce et al. (2005) ont observé, dans le golfe de Sarasota (Floride – Etats-Unis), la présence de toxines produites par *Karenia brevis* (brevétoxines, PbTx) en quantités importantes dans les aérosols collectés en bord de mer, causant des irritations du système respiratoire. Récemment, des efflorescences d'*Ostreopsis ovata* ont été observées dans le sud de la France, mais aussi en Espagne et en Italie (Kermarec et al., 2008). Cette micro-algue produit des toxines (palytoxines) qui, lors du



contact ou de l'inhalation sous forme d'aérosols, provoquent notamment des irritations (peau, yeux, système respiratoire), de la fièvre et des difficultés respiratoires (Kermarec et al., 2008).

### 1.2.1.2. Exposition alimentaire

Cependant, dans la plupart des cas, les effets provoqués par les phycotoxines sur la santé humaine interviennent suite à la consommation d'organismes marins contaminés (Van Dolah, 2000 ; Backer et al., 2003 ; 2005).

Il existe de nombreuses phycotoxines impliquées dans des intoxications humaines au niveau mondial. Du fait de leurs différents effets et des nombreuses molécules et dérivés existants, la classification des toxines est relativement complexe. Dans un premier temps, les différents types de phycotoxines décrits ont été classés par rapport à leurs effets, aux symptômes provoqués sur l'homme par leur ingestion : toxines diarrhéiques, paralysantes, amnésiantes et neurotoxiques. Par la suite, d'autres toxines ont été mises en évidence sans pouvoir être classées de manière systématique dans les catégories déjà définies. Des classements selon la nature et/ou les propriétés physico-chimiques des toxines viennent donc se superposer au classement originel.

La liste proposée ci-dessous donne les principales toxines de micro-algues décrites comme pouvant affecter la santé humaine connues à ce jour. Elle reprend principalement la classification classique basée sur leurs effets en termes de symptômes sur la santé humaine.

### 1.2.1.3. Toxines paralysantes (PSP, Paralytic Shellfish Poisoning)

La présence de toxines PSP est observée presque partout dans le monde (Figure 1) : une grande partie de l'Europe, de l'Amérique du Nord, de l'Asie, de l'Océanie, et également en Amérique du Sud et en Afrique du Sud (UNESCO, 2004 ; Toyofuku, 2006). Ces toxines sont produites par les dinoflagellés des genres *Alexandrium* (nommé auparavant *Gonyaulax*, photo ci-contre), *Gymnodinium* (*G. catenatum*) et *Pyrodinium* (*P. bahamense*), et leur type principal est la saxitoxine (STX). Dix-huit dérivés de la saxitoxine sont connus à ce jour, dont les gonyautoxines (GTXs) et la néosaxitoxine. Ce sont des toxines hydrophiles, thermostables (elles ne sont pas détruites par la cuisson des aliments) et stables en milieu acide. Leur principal mode d'action connu est le blocage des canaux sodium des cellules nerveuses, empêchant la dépolarisation et donc la transmission de l'influx nerveux. Après ingestion de coquillages contaminés, elles provoquent rapidement une paresthésie (trouble de la sensibilité appelé aussi fourmillement) brutale (en 5 à 30 minutes) des lèvres, du visage, des bras puis des jambes. Des cas graves ont été signalés avec une perte de la coordination motrice, de l'incohérence, et un risque de décès par paralysie respiratoire. La norme européenne retenue pour la consommation humaine est de 80 µg équivalent saxitoxine (éq. STX – voir 3.1.2.2) pour 100 g de chair de coquillage. A noter que la saxitoxine est responsable de la première phyco-intoxication décrite (rétrospectivement) en 1798 en Colombie-Britannique (Canada).



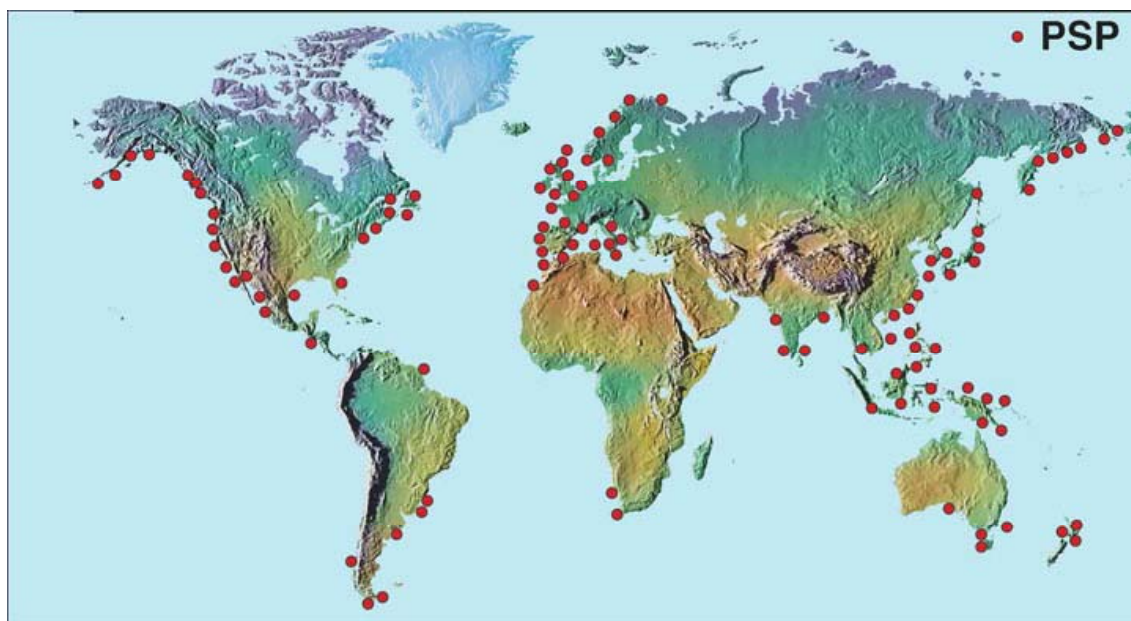


Figure 1 – Localisation des phénomènes de contamination par des PSP dans le monde rapportés en 2006 (source : <http://www.whoi.edu/redtide/page.do?pid=14899>).

Le Tableau 1 ci-dessous donne un aperçu des contaminations de coquillages par des PSTs au niveau du littoral français (métropolitain). Ces données sont extraites de la base de données du Réseau de surveillance des PHYcotoxines (REPHY-IFREMER) pour les années 1992 à 2009. Ne sont présentées que les années pour lesquelles les concentrations mesurées dans les coquillages ont dépassé  $80 \mu\text{g} \text{ éq. STX.} 100 \text{ g}^{-1}$  de chair (limite européenne pour la consommation humaine), ainsi que la concentration maximale observée toutes années confondues (l'année et l'espèce de bivalves concernées apparaissent en bleu).

Tableau 1 – Récapitulatif des contaminations de coquillages par des PSP relevées par le REPHY de 1992 à 2009.

Département	Secteur	Quantité maximale*	Espèces bivalves	Années	Période
Côtes d'Armor – Ile-et-Vilaine	Estuaire de la Rance	330	Coque ( <i>Cerastoderma edule</i> ) Moule ( <i>Mytilus</i> sp.)	1998, 1999, 2000	Juin-juillet
Finistère	Baie de Morlaix	310	Huître ( <i>C. gigas</i> ) Moule ( <i>Mytilus</i> sp.)	1994, 1996, 1997, 1999	Juin-juillet
Finistère	Abers (Finistère nord)	1003	Huître ( <i>C. gigas</i> ) Moule ( <i>Mytilus</i> sp.)	1995, 1999, 2001, 2003	Juillet-août
Gironde	Arcachon (bassin)	95	Moule ( <i>Mytilus</i> sp.)	1993, 2002, 2003	Décembre-février
Pyrénées-Orientales	étang de Salses-Leucate	83	Moule ( <i>Mytilus</i> sp.)	2007	Avril
Hérault	étang de Thau	855	Huître ( <i>C. gigas</i> ) Moule ( <i>Mytilus</i> sp.) Palourde ( <i>R. philippinarum</i> )	1998, 1999, 2001, 2003, 2004, 2007	Octobre-novembre, décembre
Var	Toulon (rade)	143	Moule ( <i>Mytilus</i> sp.)	1990, 2000	Mars, mai

\* en  $\mu\text{g} \text{ éq. STX.} 100 \text{ g}^{-1}$  de chair

En Bretagne (Finistère nord) les premières interdictions de ventes liées à des contaminations de coquillages par des PSP ont été mises en place dès 1988 (REPHY). La dernière

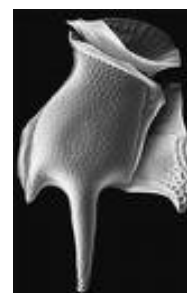
contamination de coquillages dépassant le seuil sanitaire relevée par le REPHY dans le nord du Finistère remonte à juillet 2003.

Dans la suite du présent document, le terme Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) sera préférentiellement utilisé car il fait référence aux toxines, contrairement au terme utilisé précédemment (Paralytic Shellfish Poisoning = PSP), qui renvoie à la pathologie humaine.

La toxicité des micro-algues productrices de PSTs est détaillée dans le paragraphe 3.1.2.2

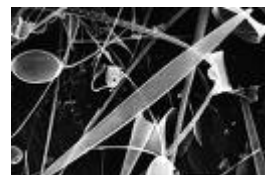
#### 1.2.1.4. Toxines diarrhéiques (DSP, Diarrheic Shellfish Poisoning)

La présence de toxines DSP est observée dans de nombreuses régions du monde : une grande partie de l'Europe de l'ouest, Canada (baie du Saint Laurent), Chili, Afrique du Sud, Inde, Japon, Nouvelle Zélande, etc (UNESCO, 2004 ; Toyofuku, 2006). Elles sont produites par les dinoflagellés des genres *Dinophysis* (photo ci-contre) et *Prorocentrum* (*P. lima*) et leur type principal est l'acide okadaïque (OA). L'OA et ses dérivés sont lipophiles et thermostables. Ils provoquent rapidement diarrhée et vomissements (en 30 minutes à 2 heures après ingestion), disparaissant spontanément en 2 à 3 jours, sans séquelles. On y associe les pectenotoxines (PTX) hépatotoxiques, les yessotoxines (YTX) sans toxicité avérée et les azaspiracides (AZA) diarrhéiques. Les normes retenues sont de 16  $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de chair de coquillage pour l'acide okadaïque et les azaspiracides, et 100  $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  pour les pectenotoxines.



#### 1.2.1.5. Toxines amnésiantes (ASP, Amnesic Shellfish Poison)

La présence de toxines ASP est essentiellement observée en Amérique du Nord, en Nouvelle Zélande, mais aussi dans plusieurs pays d'Europe tels que l'Ecosse et la France. Elles sont produites par les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* (photo ci-contre) et leur type principal est l'acide domoïque (DA). Après ingestion de coquillages contaminés, elles provoquent rapidement une gastro-entérite (diarrhée et vomissements en 2 à 24 h) puis des symptômes neurologiques, avec céphalées, confusion, désorientation, et dans les cas graves, amnésie, puis coma mortel. Les enfants et les personnes âgées sont les plus sensibles. La norme retenue pour l'acide domoïque est de 2  $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* sont repérées régulièrement l'été le long des côtes françaises, mais aucune intoxication n'a encore été déclarée en France.



#### 1.2.1.6. Neurotoxines (NSP, Neurotoxic Shellfish Poison) ou brevetoxine

Les intoxications ont surtout été rapportées dans les régions côtières de la Floride, des Caraïbes et de la Nouvelle Zélande. Les NSP sont produites par le dinoflagellé *Karenia brevis* (= *Gymnodinium breve*) (photo ci-contre) et le raphidophyte *Chattonella* cf. *verruculosa*. Leur type principal est la brevetoxine dont il existe plus de neuf formes différentes (PTX1 à



PTX3 et PTX5 à PTX10). Elles peuvent affecter les humains par ingestion (consommation d'organismes contaminés) ou lors de l'inhalation d'aérosols (embruns) contenant des cellules de micro-algues. Ces toxines affectent le système gastro-intestinal ainsi que les systèmes nerveux périphérique et central. La norme retenue est de  $80 \mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  pour la brevétoxine.

#### 1.2.1.7. Toxines ciguatériques ou ciguatera

Elles sont uniquement observées au niveau des mers tropicales, bien que des cas aient été récemment déclarés en Méditerranée orientale. Elles sont produites par le dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* (photo ci-contre), et leurs types principaux sont les ciguatoxines et les maïtotoxines. Il s'agit ici d'une intoxication alimentaire provoquée par la consommation de la chair de poissons contaminés. La micro-algue toxique se multiplie sur le squelette du corail mort et est broutée par les poissons perroquets. Ces poissons peuvent à leur tour contaminer leurs prédateurs. Le symptôme principal est une démangeaison cutanée intense, avec une gastro-entérite et une paresthésie du visage. La guérison spontanée est plus ou moins rapide, avec quelquefois des séquelles neurologiques.



#### 1.2.1.8. Toxine produite par Pfiesteria

Seules deux espèces toxiques ont actuellement été décrites : *Pfiesteria piscicida* (photo ci-contre), et *P. shumwayae*. La toxine qu'elles produisent a été identifiée récemment (Moeller et al., 2001) et est appelée *Pfiesteria* toxin (PfTX). C'est une neurotoxine hydrophile. Bien que cette espèce soit présente partout dans le monde, les efflorescences toxiques ont uniquement été décrites aux Etats-Unis avec des mortalités massives de poissons et des intoxications humaines suite à la consommation de poissons contaminés.



#### 1.2.1.9. Les spirolides

Elles sont produites par le dinoflagellé *Alexandrium ostenfeldii* (photo ci-contre) (cette espèce produit aussi des toxines paralysantes) et possèdent de nombreux isomères. Elles ont été isolées et caractérisées pour la première fois par Hu et al. (1995). Ces toxines font partie du groupe des spiroimines, qui inclut les gymnodimines, les pinnatoxines et les pteriatoxines. Les spirolides sont des neurotoxines dont les effets ont été mis en évidence chez la souris, mais dont la toxicité chez l'Homme n'a actuellement pas été démontrée. Des contaminations de bivalves ont été observées au Danemark, en Norvège, au Canada et aux Etats-Unis. En 2005, des contaminations d'huîtres, *C. gigas*, par des spirolides ont été observées dans le bassin d'Arcachon et associées à la présence d'*A. ostenfeldii*.



### 1.2.1.10. Toxines cutanées

Elles sont produites par le dinoflagellé *Ostreopsis ovata* (photo ci-contre), et leur type principal est la palytoxine. Il s'agit d'une neurotoxine susceptible de provoquer des irritations cutanées, de la fièvre et une gêne respiratoire. La contamination se fait par contact ou inhalation des embruns et consommation des produits de la pêche contaminés. L'espèce est benthique (présente dans les sédiments marins), mais remonte en surface pour la floraison. La toxine peut alors se concentrer dans la chaîne alimentaire. On la retrouve sur les côtes de Nouvelle Calédonie, de Polynésie Française, Mayotte, La Réunion et depuis peu en Méditerranée. Il y a eu quelques épisodes toxiques en Italie (1998), et une alerte à Marseille en 2006.



### 1.2.2. Exposition des organismes

Les toxines pouvant affecter la santé humaine ont probablement un impact sur les organismes marins, mais elles ne semblent pas être les seules. D'autres substances toxiques peuvent être produites par des espèces de micro-algues affectant les espèces animales ou végétales marines, sans présenter de danger connu ou démontré pour l'Homme. Plusieurs études ont pu mettre en évidence l'existence de tels phénomènes toxiques (Arzul et al., 1999 ; Tillmann and John, 2002 ; Tang et al., 2007 ; Ford et al., 2008 ; Tillmann et al., 2008), voir paragraphe 3.1.2.2.

Dans le langage courant, le terme de micro-algues toxiques est le plus souvent utilisé pour désigner les espèces de phytoplancton produisant des toxines qui peuvent affecter la santé humaine. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence l'existence de molécules, différentes des toxines pouvant affecter l'Homme, mais ayant des effets toxiques sur différents organismes marins. Il apparaît donc important de définir clairement le terme de micro-algues toxiques, de manière à éviter toute ambiguïté. Les micro-algues toxiques seront donc définies, dans le cadre de ce travail, comme **l'ensemble des espèces phyto planctoniques aquatiques connues pour produire des toxines ou des molécules toxiques ayant des effets négatifs, directement ou indirectement, sur des organismes aquatiques ou des organismes terrestres associés à des habitats aquatiques ou à leurs productions.**

Les organismes aquatiques sont exposés à des micro-algues toxiques lorsque celles-ci sont dominantes dans le milieu. On distingue les expositions directes et les expositions indirectes, ainsi que les expositions aiguës et les expositions chroniques.

#### 1.2.2.1. Exposition directe

Les organismes marins peuvent être exposés aux toxines intra-cellulaires (endotoxines) lors de l'ingestion et de la digestion des cellules algales (filtration de l'eau, prédation). Ainsi le zooplancton, les éponges et les bivalves filtreurs peuvent absorber des cellules toxiques présentes dans la colonne d'eau.

Les toxines peuvent aussi être libérées dans le milieu lors de la lyse des cellules qui peut intervenir au cours de phénomènes de sénescence, d'altération mécanique ou de stress environnemental. Le phytoplancton toxique peut aussi produire des toxines extracellulaires (exotoxines) directement dans le milieu. Par exemple, Emura et al., (2004) ont mis en évidence la production, par *Alexandrium taylori*, d'une toxine hémolytique dans le milieu extracellulaire : le surnageant de culture débarrassé des cellules de micro-algues présentait une toxicité vis-à-vis des érythrocytes de lapin et de cochon d'Inde. Les organismes sont alors directement exposés aux toxines, même s'il y a en apparence une absence de cellules dans le milieu.

#### 1.2.2.2. Exposition indirecte

Les toxines peuvent être transférées d'une espèce à une autre le long des chaînes trophiques. Elles peuvent alors être bio-accumulées (la concentration augmente lors du passage à un niveau trophique supérieur), bio-transformées (des réactions peuvent se produire et transformer la molécule originale) ou bio-magnifiées (la toxine est rendue plus néfaste). Les organismes qui survivent à l'ingestion de telles toxines peuvent être consommés par un maillon trophique supérieur. Celui-ci pourra être affecté par la toxine qui provoquera des désordres biologiques, voire la mort.

#### 1.2.2.3. Exposition aigüe

Les efflorescences de micro-algues toxiques ont généralement des effets aigus. Les organismes qui ne peuvent pas se déplacer (organismes sessiles) et fuir la contamination sont les plus touchés : c'est par exemple le cas de la majorité des bivalves. Le caractère aigu des expositions est lié au mode d'action rapide des toxines et à la forte concentration des cellules productrices de toxines. Ces expositions aiguës induisent des réponses physiologiques et cellulaires, ainsi que des lésions et des pathologies pouvant provoquer la mort des organismes.

#### 1.2.2.4. Exposition chronique

Il existe très peu d'informations concernant les effets à long terme d'une bioaccumulation de phycotoxines par les organismes marins. Pour donner un exemple, Landsberg (1996) a émis l'hypothèse de l'existence d'un lien entre la présence de néoplasie hémocytaire (cancer des hémocytes) chez certaines espèces de bivalves et une exposition chronique à des phycotoxines.

Les expositions des organismes aux micro-algues toxiques peuvent intervenir de façon directe ou indirecte. Ces deux types d'expositions peuvent avoir un caractère aigu ou chronique. Dans le cadre des travaux présentés ici, nous nous focaliserons sur les expositions directes aiguës des mollusques bivalves.

## 2. Impact des micro-algues toxiques sur la biologie et la physiologie des bivalves

Les effets des efflorescences toxiques sur les bivalves restent très souvent méconnus et très peu étudiés. Il a été démontré que le phytoplancton toxique affecte la physiologie, au sens large, des mollusques bivalves, lorsque ceux-ci sont exposés à des cultures d'algues toxiques (Shumway et al., 1985 ; Shumway and Cucci, 1987 ; Luckenbach et al., 1993 ; Wikfors and Smolowitz, 1993 ; 1995 ; Bricelj et al., 2005 ; Hégaret et al., 2005 ; 2007a ; 2007b ; 2007c ; 2009a). Deux revues (Shumway, 1990 ; Landsberg, 2002) listent les effets actuellement connus. Certaines algues toxiques ont des effets ponctuels, localisés et réversibles, d'autres, des effets beaucoup plus drastiques pouvant provoquer la mort des bivalves.

Les effets des micro-algues toxiques sur la biologie et la physiologie des bivalves peuvent être observés à plusieurs niveaux d'intégration de l'organisme. Ils peuvent intervenir à toutes les étapes de la vie des bivalves (gamètes, embryons, larves, juvéniles, adultes/géniteurs) et toucher différentes fonctions physiologiques (comportement, nutrition, digestion, immunité, métabolisme énergétique, activités cellulaires, reproduction).

### 2.1. Activité valvaire

De par leur statut de filtreurs, les bivalves peuvent être directement en contact avec les micro-algues toxiques présentes en suspension dans le milieu. Un des premiers mécanismes de défense des bivalves contre ces micro-algues toxiques consiste à en limiter l'ingestion, soit en restant fermé, soit en les rejetant sous forme de pseudo-fécès. Dans ce cas, les micro-algues ne sont donc pas ingérées.

Très peu d'études ont porté sur la modification du comportement des bivalves en lien avec une exposition à des micro-algues toxiques. Nagai et al. (2006) ont observé une augmentation de la fréquence des micro-fermetures (fermeture rapide et incomplète des valves) chez l'huître perlière, *Pinctada fucata*, exposée au dinoflagellé toxique, *Heterocapsa circularisquama*. Les auteurs soulignent que cette augmentation de fréquence est corrélée à l'augmentation de concentration de la micro-algue toxique. Plus récemment, Basti et al. (2009) ont mis en évidence une modification de comportement chez la palourde, *Ruditapes philippinarum*, exposée à *H. circularisquama*. Cette modification se traduit, comme dans l'exemple précédent, par une augmentation significative de la fréquence des adductions valvaires même pour des concentrations très faibles en micro-algues toxiques, de l'ordre de 5 cellules.ml<sup>-1</sup>. Les auteurs ont également observé une réaction de fermeture des valves qui survient d'autant plus rapidement que la concentration en *H. circularisquama* est importante (Basti et al., 2009).

Ces modifications de comportement peuvent être interprétées comme une réponse des bivalves à la présence de micro-algues toxiques dans leur environnement. Cette réponse se retrouve aussi dans leur comportement alimentaire.



## 2.2. Nutrition

Les bivalves ont, semble-t-il, la capacité de trier les particules qu'ils captent en fonction de différents critères tels que la taille des particules, leur concentration dans le milieu ou encore le contenu en matière organique (Ward et Shumway, 2004). Par contre, les bivalves ne semblent pas capables de trier les micro-algues selon un critère de toxicité. En effet, Li and Wang (2001) ont montré, en utilisant des radio-traceurs, que la moule, *Perna viridis*, et la palourde, *Ruditapes philippinarum*, nourries avec un mélange contenant deux espèces d'*A. tamarense* toxiques et non-toxiques, sont incapables d'ajuster leur ingestion en fonction de leur contenu en PSTs.

L'impact de micro-algues toxiques appartenant au genre *Alexandrium* sur les fonctions de filtration et d'ingestion de bivalves a été largement étudié (Bardouil et al., 1993 ; Wildish et al., 1998 ; Li et al., 2001 ; Bougrier et al. 2003 ; Lassus et al., 2004 ; Navarro et al., 2008 ; Fernandez-Reiriz et al., 2008). Plusieurs études ont mis en évidence une inhibition de l'activité de filtration, au moins temporaire, chez *C. gigas* (Bardouil et al., 1993 ; Wildish et al., 1998 ; Lassus et al., 2004) et *Mytilus chilensis* (Navarro et al., 2008) exposées à des micro-algues toxiques appartenant au genre *Alexandrium*. Lorsque *M. chilensis* est exposée à *A. catenella*, l'inhibition de l'activité de nutrition est réversible dans le temps. Cela suggère que les moules sont capables d'adapter leur comportement alimentaire et de se nourrir des micro-algues toxiques (Navarro et al., 2008).

Cette inhibition des activités de filtration et d'ingestion semble plus ou moins prononcée selon les espèces de micro-algues toxiques et de bivalves considérés. Elle peut être interprétée comme un mécanisme de protection permettant de limiter le contact avec les cellules toxiques.

## 2.3. Accumulation, bio-transformation et dépuration des PSTs

Certaines études, portant sur l'interaction entre *Alexandrium* sp. et les bivalves, s'intéressent aux cinétiques et aux mécanismes d'accumulation, de bio-transformation et de dépuration (élimination) des PSTs (Bricelj et Shumway 1998 ; Lassus et al., 2004 ; 2005 ; 2007 ; Guéguen et al., 2008). En effet, ces mécanismes présentent un intérêt en terme de production de bivalves et, in fine, de santé humaine : une meilleure compréhension de ces processus pourrait permettre, à terme, la mise au point de techniques favorisant l'élimination des PSTs par les bivalves.

Chez l'huître creuse, *C. gigas*, l'accumulation des PSTs se fait essentiellement au niveau de la glande digestive (Bricelj et Shumway 1998 ; Guéguen et al., 2008). La capacité des bivalves à accumuler des PSTs semble en partie liée à leur sensibilité vis-à-vis de ces toxines (Bricelj et Shumway, 1998). En effet, les espèces de bivalves dont les cellules nerveuses présentent une faible sensibilité aux PSTs, consomment activement les cellules toxiques et accumulent d'importantes quantités de toxines. A l'opposé, les espèces plus sensibles telles que l'huître américaine (*C. virginica*), accumulent moins de toxines. Bricelj et al. (2005) ont également mis en évidence une différence de sensibilité aux PSTs chez des individus appartenant à une

même espèce de bivalve, *Mya arenaria*, mais provenant de populations géographiquement éloignées. Les auteurs ont attribué cette différence intra-espèce à une mutation, responsable de la modification d'un seul acide aminé, qui conduit à diminuer (d'un facteur 1000) l'affinité de la saxitoxine pour les récepteurs des canaux sodium présents au niveau des cellules nerveuses. Ces études soulignent l'existence d'une variabilité inter-espèces, mais aussi inter-populations (intra-espèce), de la sensibilité des bivalves vis-à-vis des PSTs.

De nombreux facteurs environnementaux, tels que la température ou encore la présence de phytoplancton non-toxique dans la nourriture, influencent également l'accumulation et la détoxification (dépuración) des PSTs par les bivalves (Moronó et al., 2001 ; Guéguen et al., 2008).

Les bivalves sont également capables de biotransformer les PSTs qu'ils ont accumulées par divers processus tels que des conversions enzymatiques. La quantification des différents épimères des PSTs permet d'estimer la proportion de toxines biotransformées. En effet, les épimères  $\beta$  représentent la configuration préférentiellement synthétisée dans les cellules des dinoflagellés. La proportion d'épimères  $\alpha$  augmente graduellement à mesure de l'ingestion et la digestion des micro-algues toxiques. Bricelj and Shumway (1998) soulignent que lors de la bioconversion des PSTs, le ratio  $\beta/\alpha$  diminue pour atteindre une valeur proche de 0,33.

Les toxines accumulées par les bivalves, ainsi que d'autres molécules toxiques potentiellement produites par les micro-algues, peuvent induire des modulations de certaines fonctions de l'organisme ou impacter différents organes.

## 2.4. Système digestif

L'exposition de bivalves à des micro-algues toxiques peut affecter la digestion et l'allocation d'énergie. Li et al. (2002) ont étudié l'effet d'*A. tamarensis* sur le budget énergétique, évalué par une approche « scope for growth » (SFG), de la moule, *Perna viridis*, ainsi que de la palourde, *Ruditapes philippinarum*. Les auteurs ont suggéré un lien entre l'augmentation de l'accumulation des PSTs et une diminution significative du SFG chez ces deux bivalves, principalement à cause de la diminution de l'efficacité d'absorption (Li et al., 2002). Fernandez-Reiriz et al. (2008) ont démontré que l'exposition de *Mytilus chilensis* à *Alexandrium catenella* pouvait aboutir à une inhibition temporaire des processus digestifs, notamment une diminution des activités enzymatiques.

Pearce et al. (2005) ont observé que des larves de *C. gigas* exposées à *Prorocentrum rhathymum* présentaient un amincissement de l'épithélium des tubules digestifs ainsi qu'une exfoliation des cellules de l'épithélium dans la lumière de ces mêmes tubules. Des réactions inflammatoires, notamment des infiltrations et des diapédèses hémocytaires (passage des hémocytes entre les cellules de l'épithélium depuis le tissu conjonctif vers la lumière de l'estomac ou de l'intestin), ont également été observées dans différents tissus de la glande digestive de *M. edulis* exposée à *A. fundyense* (Galimany et al., 2008a), *Prorocentrum minimum* (Galimany et al., 2008b) et *Karlodinium veneficum* (Galimany et al., 2008c). Lors de l'exposition des moules à *A. fundyense*, les auteurs ont également constaté une dégradation

importante des conduits et des tubules digestifs après neuf jours d'exposition (Galimany et al., 2008a). Hégaret et al. (2009a) ont également observé des réactions inflammatoires dans le système digestif de la palourde, *R. philippinarum*, exposée à *P. minimum*.

Les micro-algues toxiques affectent le système digestif des bivalves exposés, mais semblent aussi provoquer une réaction immunitaire, comme le suggèrent les réactions inflammatoires observées chez différentes espèces de bivalves.

## 2.5. Système immunitaire

La principale ligne de défense des bivalves réside dans leur système immunitaire, lorsqu'ils font face à des agents toxiques, nocifs ou pathogènes (Cheng, 1996). Les mollusques bivalves sont des invertébrés et possèdent un système immunitaire de type inné (Janeway, 1994), à médiation cellulaire et humorale. Récemment, des études ont conclu à l'existence d'une réponse spécifique chez les invertébrés, laissant supposer que ceux-ci possèdent un système immunitaire acquis (Rowley et Powell, 2007). Chez les bivalves, les fonctions de défense s'organisent au sein de leur système circulatoire semi-ouvert, le système hémolymphatique. Le système immunitaire à médiation humorale est constitué par un ensemble de molécules actives produites par les hémocytes (phénoloxidase, enzymes lysosomales, peptides antimicrobiens,...). Le système immunitaire à médiation cellulaire est porté par les hémocytes, qui sont aussi impliqués dans la nutrition, la formation et la réparation de la coquille.

Les hémocytes jouent un rôle essentiel dans l'inflammation, la réparation des tissus endommagés, ainsi que dans la phagocytose et l'encapsulation de corps étrangers, couvrant ainsi les fonctions connues de plusieurs types cellulaires (granulocytes, macrophages, plaquettes) chez les vertébrés.

Plusieurs observations histo-pathologiques ont montré que les hémocytes sont impliqués dans les réponses des bivalves lors d'une efflorescence d'algues toxiques (Wikfors and Smolowitz, 1993 ; 1995 ; Galimany et al., 2008a ; 2008b ; 2008c). Les effets des efflorescences de phytoplancton toxique sur la réponse immunitaire des bivalves ont fait l'objet d'études récentes. Elles ont permis de mettre en évidence une modulation du système immunitaire des bivalves par le phytoplancton toxique : dans certains cas, le système immunitaire semble plutôt stimulé (augmentation des capacités d'adhésion, de phagocytose et de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les hémocytes), alors que dans d'autres cas le système immunitaire semble plutôt inhibé (immuno-suppression) (Hégaret, 2007).

Plusieurs espèces de micro-algues toxiques (*A. fundyense*, *Amphidinium carterae*, *Heterosigma akashiwo*, *K. veneficum*, *Karenia* sp.) ont montré des effets immunosuppresseurs lors d'interactions *in vitro* avec les hémocytes de différentes espèces de bivalves Hégaret (2007). Hégaret et al. (2007c) ont observé une immuno-suppression chez la palourde *R. philippinarum* exposée à *Karenia selliformis* et *K. mikimotoi*. Par ailleurs, une corrélation positive entre la quantité de PSTs accumulée et le pourcentage d'hémocytes morts, a été observée chez *C. gigas* exposée à *A. catenella* (Hégaret et al., 2007a). Cette relation peut

être interprétée comme un effet immunosuppresseur de la micro-algue toxique, bien que les autres paramètres hémocytaires présentent peu de variations.

Les réactions inflammatoires décrites dans le paragraphe 2.4 pourraient aussi être interprétées comme un effet de stimulation du système immunitaire des bivalves en présence de micro-algues toxiques. Par exemple, des agrégats d'hémocytes ont été observés dans l'intestin de la palourde, *R. philippinarum*, exposée à *Prorocentrum minimum* (Hégaret et al., 2009a), ce qui suggère une stimulation du système immunitaire.

Ces différentes études illustrent la diversité et la complexité des effets que peuvent avoir les micro-algues toxiques sur le système immunitaire des bivalves. Celui-ci peut-être stimulé ou inhibé en fonction du couple bivalve / micro-algue toxique considéré.

## 2.6. Reproduction et recrutement

La majorité des études concernant l'impact des micro-algues toxiques sur le cycle de reproduction des bivalves, s'intéresse au développement embryonnaire et larvaire (Yan et al., 2001 ; 2003 ; Springer et al., 2002 ; Leverone et al., 2006 ; Padilla et al., 2006 ; Shumway et al., 2006). L'impact direct d'une micro-algue toxique sur le recrutement d'un bivalve, *Argopecten irradians concentricus*, a été observé en milieu naturel (Caroline du Nord, Etats-Unis) lors d'une efflorescence de *Ptychodiscus brevis* (*Karenia brevis*) survenue en 1987 (Summerson and Peterson, 1990). Les auteurs ont observé, à posteriori, un taux de recrutement des pétoncles égal à 2% du taux de recrutement moyen des trois années précédentes. Yan et al. (2001) ont observé que la micro-algue productrice de PSTs, *A. tamarense*, diminuait significativement le taux d'éclosion des œufs fertilisés ainsi que la survie des larves du pétoncle, *Chlamys farreri*, lors d'expositions *in vitro*. Cette même micro-algue toxique provoque également une diminution importante du taux de croissance et des capacités de fixation des larves du pétoncle *Argopecten irradians concentricus* (Yan et al., 2003).

À notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la qualité des gamètes produits par des bivalves préalablement exposés à des micro-algues toxiques. Cependant, Galimany et al. (2008a ; 2008b) ont observé la présence d'agrégats hémocytaires dans les follicules gonadiques ainsi que la dégradation des ovocytes de *M. edulis* exposée respectivement à *Prorocentrum minimum* et *A. fundyense*.

Comme nous venons de le voir, les micro-algues toxiques peuvent affecter différentes fonctions, organes et tissus des bivalves. Le modèle d'interaction choisi concerne *A. minutum*, espèce fréquemment mise en cause lors de contaminations de bivalves par des PSTs sur le littoral français. Ces contaminations touchent plus particulièrement l'huître creuse, *C. gigas*, l'organisme cible intégré dans notre modèle d'interaction.



### 3. Le modèle d'étude : *Alexandrium minutum* – *Crassostrea gigas*

#### 3.1. *Alexandrium minutum*

*A. minutum* est une espèce de dinoflagellé. Les dinoflagellés constituent un groupe particulier du phytoplancton, dont les caractéristiques principales sont brièvement décrites ci-après.

##### 3.1.1. Les dinoflagellés

Les dinoflagellés appartiennent à l'un des trois groupes majoritaires des Alvéolés (qui comprend aussi les ciliés et les apicomplexes) qui est constitué de protistes de formes et de physiologies diverses (Figure 2).

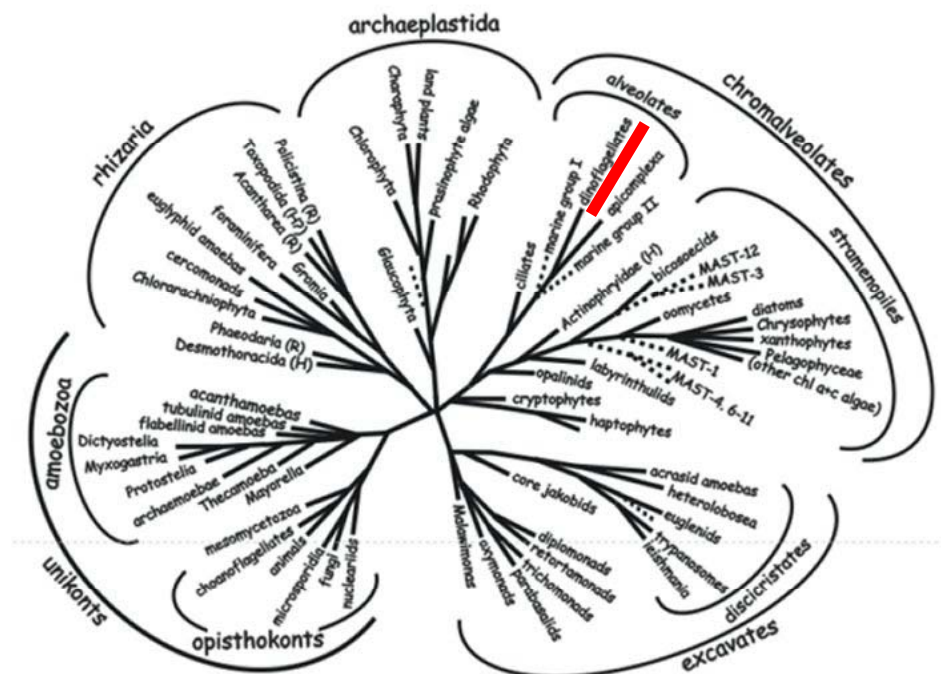


Figure 2 – Schéma de l'arbre phylogénétique consensus des Eucaryotes basé sur l'analyse des gènes codant la HSP70, l' $\alpha$ -tubuline, la  $\beta$ -tubuline ainsi que sur des gènes ribosomiaux codant la petite et la grande sous unité du ribosome, mis à jour par Sandra Baldauf. Les séquences environnementales découvertes par ciPCR sont illustrées par des pointillés (Baldauf, 2003).

Les dinoflagellés sont issus de plusieurs endosymbioses réalisées au cours de leur évolution, comme en témoigne la variété de chloroplastes observée dans les espèces de dinoflagellés. Il y a eu en effet, chez un ancêtre du groupe, une endosymbiose secondaire avec un eucaryote de la lignée rouge (Figure 3). Certains dinoflagellés ont perdu cet endosymbiote, et parmi ceux-ci beaucoup sont restés hétérotrophes. Mais d'autres ont effectué une endosymbiose dite tertiaire avec des Straménopiles, des Cryptophytes ou d'autres dinoflagellés. Ces multiples endosymbioses expliquent certainement la complexité de la phylogénie et la physiologie des dinoflagellés.

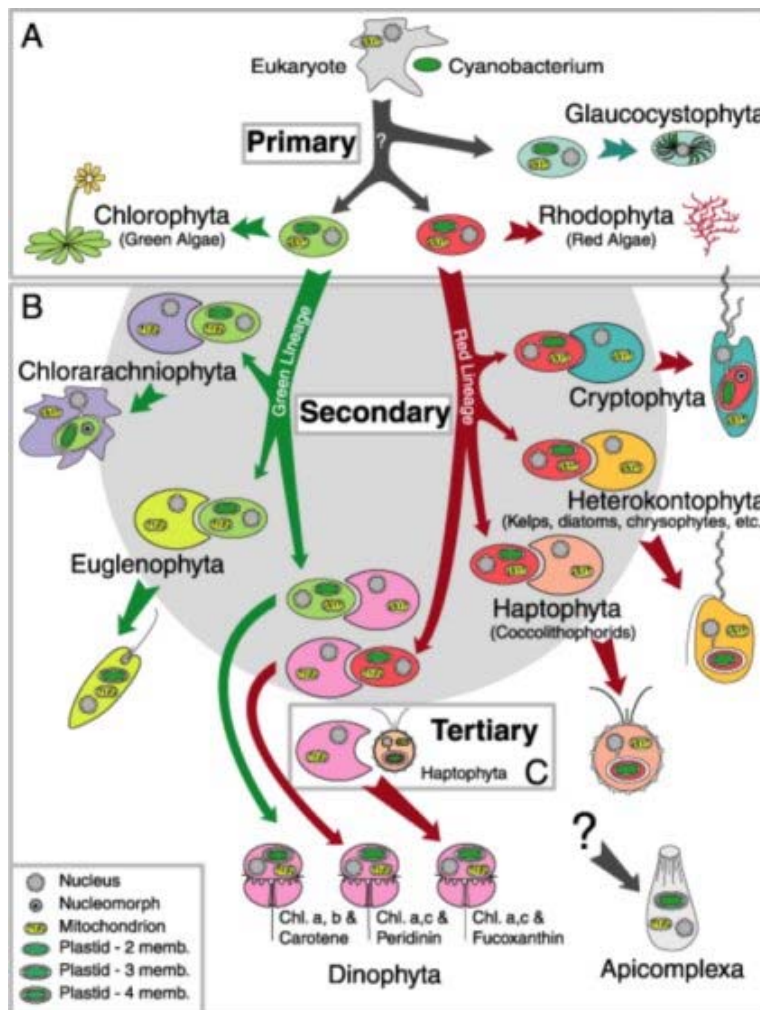
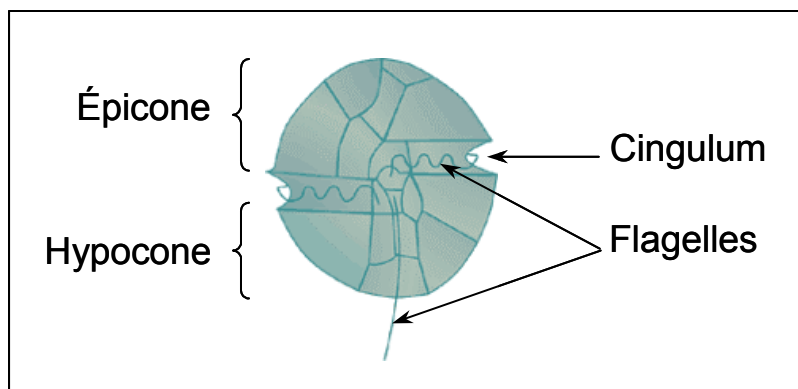


Figure 3 – Schéma récapitulatif représentant une des hypothèses des événements de l'endosymbiose expliquant la formation des plastides (Delwiche, 1999).

Le noyau des dinoflagellés, appelé dinocaryon, est original. Lors de l'interphase, l'ADN n'est pas associé à des histones comme chez les autres eucaryotes, mais complexé à une protéine basique particulière, et les chromosomes sont en permanence condensés en hélice (Moreno Díaz de la Espina et al., 2005).

### 3.1.2. Le genre *Alexandrium*

Dans la classe des dinoflagellés (Dinophyceae ou Dinophytes), le genre *Alexandrium* appartient à la famille des Goniendomataceae, ordre des Péridiniales, et compte une trentaine d'espèces (Lilly et al., 2005). Les micro-algues appartenant au genre *Alexandrium* sont des eucaryotes unicellulaires, autotrophes (bien que des cas d'hétérotrophie/mixotrophie aient été mis en évidence, Jacobson et Anderson, 1996) et biflagellés. La cellule est protégée par une thèque constituée de plaques rigides composées de cellulose. Ces plaques sont contenues dans les alvéoles sous-corticaux propres aux alvéolés (*Alveolata*). Le sillon du flagelle équatorial, appelé cingulum, permet de séparer la cellule en une partie supérieure (l'épicone) et une partie inférieure (l'hypocone) (Figure 4).

Figure 4 – Constitution d'*Alexandrium minutum*

### 3.1.2.1. Principales espèces et répartition

Le genre *Alexandrium*, qui compte une trentaine d'espèces, est présent dans tous les océans et mers de la planète. Plusieurs d'entre elles ont été identifiées dans les eaux du littoral français à partir de 1984 (date de création du REPHY):

- principalement : *A. minutum*, *A. tamarense* et *A. catenella* et des espèces non identifiées d'*Alexandrium* (*Alexandrium* sp.)
- en faible proportion : *A. affine*, *A. margalefi*, *A. pseudogonyaulax* et *A. ostenfeldii*
- de façon très ponctuelle : *A. andersoni*, *A. hiranoi*, *A. insuetum*, et *A. leei*

Seules les espèces *A. ostenfeldii*, *A. tamarense*, *A. catenella* et *A. minutum* sont connues pour être toxiques. Ces espèces peuvent potentiellement produire des PSTs (*A. tamarense*, *A. catenella* et *A. minutum* ont été reconnues responsables de contaminations de bivalves sur le littoral français) et *A. ostenfeldii* peut également produire des spirolides (voir partie 1.2.1).

Le tableau ci-après (Tableau 2) donne un aperçu des efflorescences de différentes espèces d'*Alexandrium* au niveau du littoral français (métropolitain). Ces données sont extraites de la base de données du REPHY pour les années 1992 à 2009. Ne sont présentées que les années pour lesquelles les efflorescences ont dépassé une concentration de 100 000 cellules par litre d'eau de mer, ainsi que la concentration maximale observée toutes années confondues (l'année concernée apparaît en bleu).



Tableau 2 : Récapitulatif des efflorescences de différentes espèces d'*Alexandrium* au niveau du littoral français (métropolitain), relevées par le REPHY entre 1992 et 2009, limitées aux efflorescences qui dépassent 100 000 cellules par litre d'eau de mer.

Département	Secteur	Espèces	Concentration maximale d' <i>Alexandrium</i> *	Années	Période
Côte d'Armor – Ile-et-Vilaine	Estuaire de la Rance	<i>A. minutum</i>	728 000	1996 à 2000, 2002, 2003, 2009	Juin-juillet
Finistère	Baie de Morlaix	<i>A. minutum</i>	24 620 000	1992 à 2003 (1995), 2005, 2007	Juin-juillet (août)
Finistère	Abers (Finistère nord)	<i>A. minutum</i>	13 850 000	1995, 1999, 2001, 2003	Juillet-août
Finistère	Aven Belon et Laita	<i>A. minutum</i>	1 520 000	2001	Juin
Pyrénées-Orientales	étang de Salses-Leucate	<i>A. minutum</i>	3 606 000	2009	Janvier
Hérault	étang de Thau	<i>A. tamarense</i> + <i>catenella</i> + <i>tamutum</i> ( <i>A. pseudogonyaulax</i> )	1 270 000	1998 à 2004 (2001), 2007, 2008	Mai-juillet (août) septembre-novembre
Bouches-du-Rhône	Grd étang de Berre	<i>Alexandrium hiranoi</i>	158 600	1996	Octobre
Corse	étang de Diana Urbino	<i>A. minutum</i>	110 000	1999	Avril

\* concentration maximale observée toutes années confondues exprimée en cell.L<sup>-1</sup>

## *Alexandrium minutum*

L'espèce *A. minutum* a été observée dans de nombreuses régions du monde (Egypte, Turquie, Afrique du Sud, Australie, Nouvelle-Zélande, Jamaïque, Taïwan,...) mais aussi en Europe (Royaume-Uni, Espagne, Italie, Grèce, Irlande, et France). Dans les eaux côtières françaises, jusqu'en 1998, seule l'espèce *A. minutum* a été décrite comme productrice de phycotoxines paralysantes. La première prolifération d'*A. minutum* a été observée dans l'Aber-Wrac'h et l'Aber-Benoît (Bretagne nord) en août 1988. Au printemps 2000, un épisode de toxicité PSP a eu lieu en rade de Toulon, suite à une prolifération d'*A. minutum*. Cette espèce avait déjà été observée dans cette zone, en particulier en 1990, avec de très fortes concentrations.

### 3.1.2.2. Production de Toxines

Une dizaine d'espèces d'*Alexandrium* sont connues au niveau mondial pour produire des toxines paralysantes ou PSTs (Paralytic Shellfish Toxins), comme par exemple *A. tamarense*, *A. catenella* et *A. minutum*. Ces toxines sont susceptibles d'affecter la santé humaine lors notamment de l'ingestion de coquillages contaminés.

Les différentes formes de saxitoxines (STX) produites par certaines espèces d'*Alexandrium* peuvent être classées en fonction de leur toxicité évaluée à partir de tests souris : 1) les plus toxiques sont les carbamates : STX, NéoSTX, les GTX1-GTX4 ; 2) les moins toxiques sont

les N-sulfocarbamoyles : B1, B2, C1-C4 ; 3) les dérivés décarbamoyl (dcGTX1-dcGTX4) ont une toxicité intermédiaire (Bricelj et Shumway, 1998). La concentration de chaque dérivé de la STX mesurée dans un échantillon est ramenée à son équivalent en terme de toxicité par rapport à la STX selon le facteur de conversion mis au point par Oshima (1995).

La production de toxines par *A. minutum* (comme les autres espèces d'*Alexandrium*) dépend notamment des conditions environnementales telles que la température, la salinité, l'éclairement, le pH et les sels nutritifs (Hwang et Lu, 2000). Les optimums de croissance et de production de toxines varient d'une espèce à l'autre, mais aussi au sein d'une même espèce, entre différents isolats (souches). Par exemple, une souche d'*A. minutum* (AM89BM) isolée en France peut produire 1,5 pg STX eq.cellule<sup>-1</sup> (Lassus et al., 2004) alors qu'une souche de la même espèce (AMABOP006) isolée en Nouvelle Zélande peut produire 11 pg STX eq. cell<sup>-1</sup> (Chang et al., 1997). Chou et al. (2004) ont observé que différents clones appartenant à l'espèce *A. minutum* isolés au sud de Taïwan, pouvaient produire entre 11 et 103 pg STX eq.cell<sup>-1</sup>.

Même si ce n'est pas l'objectif du présent travail, il semble intéressant de présenter dans cette partie de contexte scientifique, les méthodes de détection des PSTs mises à la disposition des décideurs avec leurs principaux avantages et leurs limites.

Les PSTs peuvent être quantifiées par diverses méthodes d'HPLC. Les avantages de ces méthodes résident dans le seuil de détection (1 µg eq. STX 100 g<sup>-1</sup> de chair de coquillage) et dans la possibilité de quantifier les différents dérivés de la STX présents dans un échantillon.

La seconde méthode utilisée est le « test souris » (Mouse Bioassay – MBA – AOAC, 1990), qui a été retenu pour évaluer la toxicité des produits de consommation humaine. Bien que sa limite de détection soit relativement élevée (37 µg eq. STX 100g<sup>-1</sup> de chair de coquillage), ce test présente l'avantage de mettre en évidence une éventuelle toxicité qui ne serait pas liée à une toxine connue. En effet, des toxicités atypiques (c'est-à-dire une mortalité des souris injectées sans qu'aucune toxine connue n'ait pu être identifiée par des analyses chimiques) ont parfois été mises en évidence, comme cela a été le cas dans le Bassin d'Arcachon en 2006 sur des échantillons de moules et d'huîtres creuses (REPHY, projet TACA : Toxicité Atypique des Coquillages du bassin d'Arcachon).

Les PSTs ne sont pas les seules molécules toxiques produites par les espèces appartenant au genre *Alexandrium*. Tillmann et John (2002) ont mis en évidence une toxicité chez différentes espèces d'*Alexandrium* vis-à-vis de dinoflagellés hétérotrophes (*Oblea rotunda* et *Oxyrrhis marina*) sans que les PSTs ne soient mises en cause. De la même façon, Ford et al. (2008) ont observé des effets négatifs provoqués par une souche d'*A. tamarense* non productrice PSTs sur des hémocytes de myes (*Mya arenaria*) et de palourdes (*R. philippinarum*). D'autre part, Tang et al. (2007) ont mis en évidence la production d'une ichtyotoxine hydrosoluble par le dinoflagellé *A. leei*. L'espèce *A. minutum* produit des molécules extracellulaires ayant une toxicité vis-à-vis d'autres organismes phytoplanctoniques (substances allélopathiques), notamment en limitant leur croissance (Arzul et al., 1999).

### 3.1.2.3. Physiologie

Le dinoflagellé *A. minutum* est une espèce exclusivement marine, mais elle supporte une certaine dessalure. Les efflorescences d'*A. minutum* se produisent généralement dans des environnements côtiers riches en nutriments, particulièrement dans les ports, les estuaires et les lagons (Vila et al., 2005). De plus, ces efflorescences semblent être associées à une stratification de la masse d'eau (salinité) et à un apport local d'eau douce (continentale) riche en nutriments (Erard-Le Denn, 1997).

Deux types de reproduction ont été observés chez les espèces appartenant au genre *Alexandrium* (Figure 5) : une multiplication végétative (division par mitose des cellules végétatives) et une reproduction dite « sexuée » issue de la fusion de deux « gamètes ». Il ne s'agit pas d'une reproduction sexuée au sens strict (dans le sens où il n'y a pas émission de gamètes), mais de la fusion de deux cellules appelées + et -.

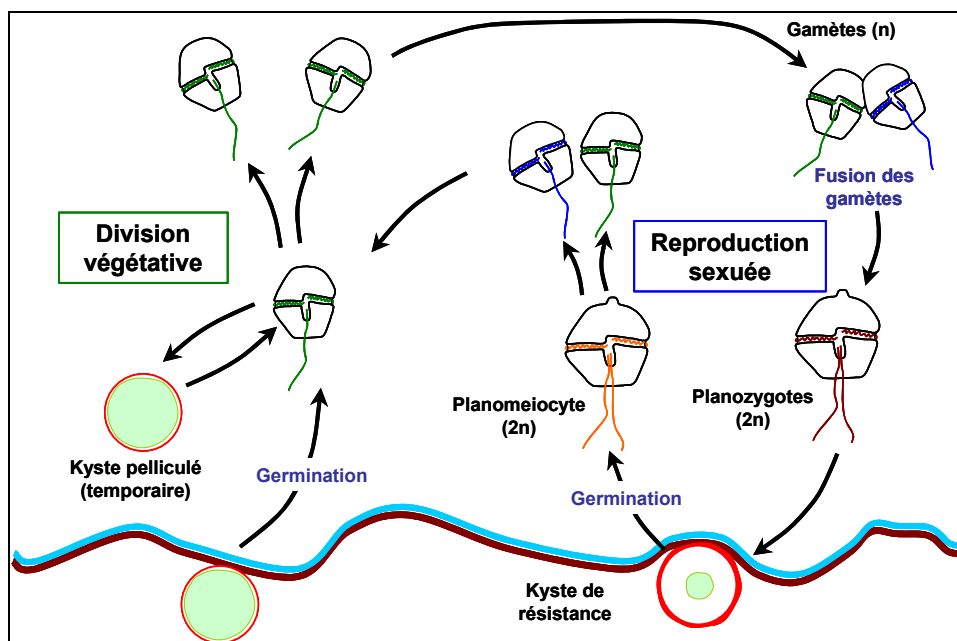


Figure 5 – Cycle de reproduction d'*Alexandrium minutum*

De nombreuses souches de différentes espèces d'*Alexandrium* ont été isolées et cultivées en laboratoire, ce qui a permis d'en étudier la physiologie, mais aussi les interactions avec d'autres organismes.

### 3.1.2.4. Formation de kystes

Les espèces de micro-algues appartenant au genre *Alexandrium* peuvent prendre des formes de résistance en formant des kystes. Deux types de kystes sont observés : les kystes de résistance, issus de la reproduction sexuée (fusion de deux « gamètes »), et les kystes temporaires (encore appelés kystes pelliculés ou kystes ecdysaux) qui, par opposition, ne sont pas issus de la reproduction sexuée (Fistarol et al., 2004). Cependant, la limite marquée par le caractère « reproductif » des kystes ne semble pas absolue. En effet, Figueroa et al. (2008) ont constaté une division des kystes temporaires lors de leur germination chez *A. peruvianum*. Ils

pourraient donc, chez certaines espèces d'*Alexandrium*, participer à la reproduction végétative.

Les kystes de résistance (kystes hypnozygotes) sont issus de la fusion de deux « gamètes » (les termes cellules + et – sont généralement employés) et présentent une morphologie différente des cellules végétatives. L'existence de réserves, de « banques » de kystes dans les sédiments des milieux côtiers est une des hypothèses avancées, favorisant la réapparition des efflorescences. Ainsi, *A. minutum* forme des kystes de résistance qui s'enfouissent dans le sédiment pour l'hiver. Certaines zones de Bretagne Nord sont régulièrement touchées par des proliférations d'*A. minutum* en été, les kystes présents dans le sédiment trouvant à cette période de l'année les conditions adéquates pour redonner des cellules végétatives.

Les kystes temporaires se forment généralement lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables ou lors d'un stress physique ou chimique. Ils apparaissent par exemple lors d'une carence en nutriments (Doucette et al. 1989), d'un changement de température (Grzebyk et Berland, 1996), du vieillissement des cultures (Østergaard et Moestrup, 1997) ou encore lors d'interactions allélopathiques (Fistarol et al., 2004). Ils présentent une morphologie différente des cellules végétatives mais aussi des kystes de résistance (Figuerola et al., 2007 ; Bravo et al., 2009). Lors de la formation des kystes temporaires, la cellule végétative perd sa thèque ainsi que ses flagelles et prend une forme arrondie. Des changements morphologiques et physiologiques se produisent. Une nouvelle paroi, appelée pellicule, se forme (Sekida et al., 2001) : elle semble être faiblement perméable (Montresor, 1995 ; Garcés et al., 1998) et résistante à de nombreux agents chimiques (Morrill et Loeblich, 1981). Les kystes temporaires résistent par exemple à la digestion lors de leur consommation par les bivalves : ils ont été observés dans le système digestif (Laavir et al., 2007) ainsi que dans les fèces et pseudo-fèces (Hégaret et al., 2007c). D'autres changements se produisent comme par exemple une modification du contenu en toxines des kystes par rapport aux cellules végétatives. Ainsi, Persson et al. (2006) ont observé que les kystes temporaires formés par *A. fundyense* contenaient 1,7 pg eq. STX par kyste alors que les cellules végétatives en contenaient 3,9 pg eq. STX par cellule.

### 3.2. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est un mollusque bivalve de l'ordre des Filibranchia, famille des Ostreidae, originaire d'Asie. Elle a été introduite sur les côtes américaines et européennes au cours du XX<sup>ième</sup> siècle. Elle est cultivée dans de nombreux pays du monde et sa production mondiale est évaluée à plus de 4,2 millions de tonnes en 2007.

La biologie et la physiologie de l'huître creuse, *C. gigas*, ont été le sujet de nombreuses études (Bado-Nilles et al., 2007 ; 2009 ; Delaporte et al., 2007a ; 2007b ; Enríquez-Díaz et al., 2009 ; Lambert et al., 2007a ; 2007b ; Samain et al., 2007 ; Samain et McCombie, 2008) et ne feront donc pas l'objet d'un développement détaillé dans cette première partie mais seulement d'une revue très rapide.

### 3.2.1. Biologie

Les huîtres creuses, *C. gigas*, sont des animaux filtreurs, peuplant des substrats meubles ou durs dans des zones intertidales et infralittorales. Elles peuvent se développer dans des biotopes différents grâce à leur tolérance aux variations de température (eurythermes) et de salinité (euryhalines).

### 3.2.2. Anatomie

Les huîtres sont des animaux dont le corps mou est enfermé dans une coquille à deux valves asymétriques articulées autour d'une charnière et maintenues par un muscle adducteur. Les parties molles du corps de l'huître sont enveloppées dans un manteau, qui délimite la cavité palléale (Figure 6). Le système digestif est composé de la bouche, l'oesophage, l'estomac, la glande digestive, l'intestin, le rectum et l'anus. Les branchies, de forme lamellaire et constituées de filaments ciliés, assurent la double fonction de respiration et de nutrition. Les filaments ciliés assurent une circulation de l'eau qui permet un apport en oxygène et en particules alimentaires. Les branchies sécrètent aussi un mucus permettant de piéger les particules alimentaires qui seront ensuite ingérées. Les huîtres ont un système circulatoire semi-ouvert : le fluide circulant, l'hémolymph, n'est pas confiné aux vaisseaux et au coeur et peut s'insinuer librement au sein de tous les tissus. Le coeur est simple, composé d'un ventricule et de deux oreillettes. Le système nerveux est réduit à quelques ganglions difficilement observables. Le système excréteur est constitué d'un rein formé d'une glande tubulaire.

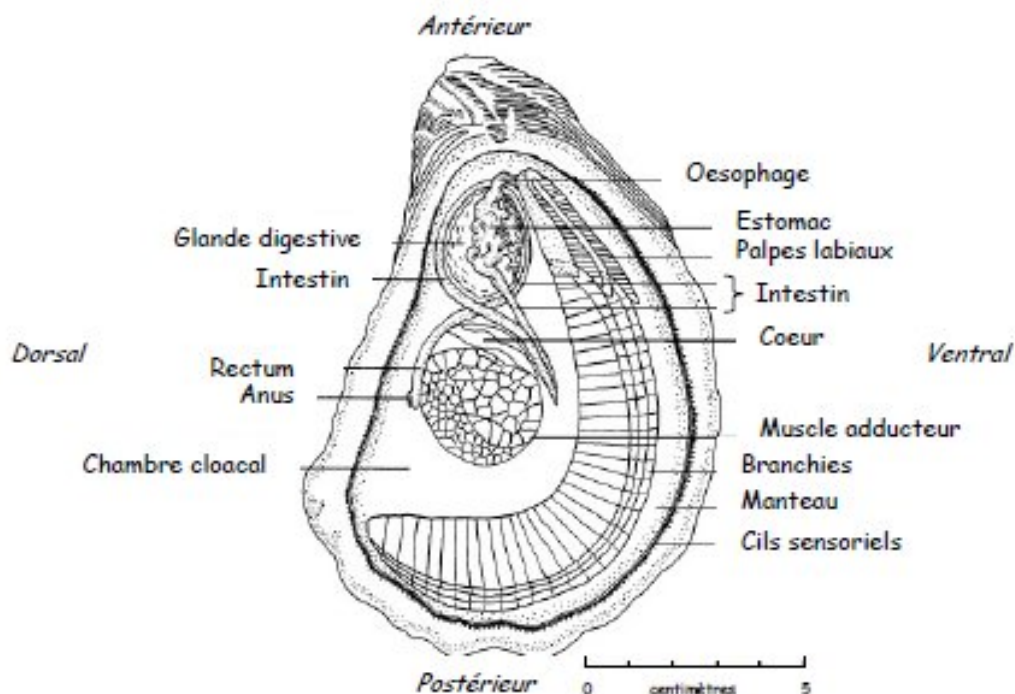


Figure 6 – Anatomie générale d'une huître dans sa valve gauche. Les axes orientaux de l'animal sont indiqués en caractère gras et en italique. (adapté par Delaporte, 2005, d'après Gatsoff, 1964 ; exemple *C. virginica*).

### 3.2.3. Nutrition et système digestif

Les huîtres sont des organismes filtreurs, microphages, se nourrissant de petites particules en suspension dans la colonne d'eau (bactéries, phytoplancton, ...). Les particules alimentaires sont captées par les branchies puis dirigées vers les palpes labiaux. Les palpes labiaux participent au tri et au guidage des particules nutritives vers le tractus digestif. Les particules pénètrent dans celui-ci par la bouche, située entre les palpes labiaux, suivie d'un court oesophage. Elles atteignent ensuite l'estomac où commence la digestion grâce à l'action du stylet cristallin, animé de mouvements de rotation et libérant des enzymes digestives. Les éléments assimilables sont dirigés vers les diverticules digestifs (conduits et tubules digestifs). Les éléments non assimilables sont évacués via l'intestin et le rectum, puis débouchent sur l'anus.

### 3.2.4. Reproduction

Les huîtres creuses possèdent un mode de reproduction primitif, avec une fécondation externe et un hermaphrodisme successif protandrique. La phase de repos sexuel se situe pendant l'hiver, période de changement de sexe. Au printemps, à la faveur de conditions environnementales favorables, la gamétogenèse reprend à partir des cellules germinales, pour arriver à maturité sexuelle au cours de l'été. La fécondation est externe : les gamètes mâles et femelles sont libérés directement dans le milieu et la fécondation a lieu en « pleine eau ».

### 3.2.5. Muscle adducteur

L'huître possède un organe musculaire principal, le muscle adducteur, servant à l'ouverture et fermeture de la coquille. Il est composé de 2 parties : la plus grande, translucide, est constituée d'un muscle strié qui permet une fermeture rapide des valves (réflexe), la seconde partie, blanche, est constituée d'un muscle lisse qui permet le maintien de la fermeture des valves (résistance).

### 3.2.6. Mécanismes de défense

La coquille et le manteau constituent une protection mécanique contre les agressions extérieures. En cas de danger les huîtres peuvent fermer leur coquille. Lorsque la coquille est ouverte, le manteau fait office de filtre, rejetant les particules trop grosses.

Le système immunitaire des huîtres possède des mécanismes de reconnaissance soi/non-soi. Il a été décrit dans un premier temps comme non adaptatif (système immunitaire inné). Cependant, certaines études ont conclu à l'existence d'une réponse spécifique chez les invertébrés, laissant supposer que ceux-ci possèdent un système immunitaire acquis (Rowley et Powell, 2007). Deux grands types de réponses immunitaires sont distingués : une voie cellulaire et une voie humorale.

### 3.2.6.1. Immunité cellulaire

Elle comprend les mécanismes de défense impliquant les hémocytes eux-mêmes. Les trois phénomènes principaux sont : l'infiltration, la phagocytose et l'encapsulation.

L'infiltration conduit à une forte concentration d'hémocytes sur le site de la lésion ou de l'infection. Les hémocytes permettent la destruction ou l'isolement de l'organisme étranger, la réparation du tissu, et, dans quelques cas extrêmes, la destruction du tissu de l'hôte.

La phagocytose est le mécanisme le plus important et le mieux décrit car il a fait l'objet d'études *in vitro* (Lambert et al., 2003 ; Goedken et De Guise, 2004). Les différentes étapes sont similaires à celles décrites chez les mammifères. Après la reconnaissance et l'adhésion de la particule étrangère par l'hémocyte, la membrane cytoplasmique de celui-ci englobe la particule. L'internalisation de la particule dans le cytoplasme de l'hémocyte se fait sous forme d'un phagosome qui fusionne avec un ou plusieurs lysosomes pour former le phagolysosome. La particule est alors détruite par l'action de différentes molécules (enzymes lysosomiales, espèces réactives de l'oxygène,...).

L'encapsulation concerne les agents pathogènes de grande taille ne pouvant pas être phagocytés : l'agent infectieux est entouré de plusieurs couches cellulaires afin d'être isolé du reste de l'organisme.

### 3.2.6.2. Immunité humorale

Il s'agit de l'ensemble des substances cytotoxiques, véhiculées par l'hémolymphe, luttant contre des agents pathogènes, des toxines ou des polluants (Chu, 1988 ; Xue, 1998 ; Roch, 1999). Différents types de molécules ont été identifiées, telles que les enzymes hydrolytiques, les lectines, le système prophénoloxydase-phénoloxydase, les peptides anti-microbiens ou encore les peroxydases.

### 3.2.6.3. Ploïdie

Les huîtres creuses triploïdes font l'objet d'une utilisation de plus en plus fréquente en ostréiculture. En effet, elles se distinguent des huîtres diploïdes par une gamétogenèse réduite ainsi qu'une croissance plus rapide (Nell, 2002). De plus, une meilleure résistance aux mortalités estivales a été observée (Samain et McCombie, 2008). Ces constatations ont donc conduit à s'interroger sur l'interaction de cet organisme particulier avec les micro-algues toxiques.

## 4. Conclusion

Comme nous venons de le voir, les micro-algues toxiques sont représentées par un nombre important d'espèces ayant des caractères morphologiques et physiologiques variés. Lors d'éventuelles perturbations de leur environnement, certains dinoflagellés peuvent modifier ces caractères : c'est par exemple le cas des espèces appartenant au genre *Alexandrium*. Ces modifications peuvent avoir des implications lors de l'interaction de ces dinoflagellés avec *C. gigas*. C'est pourquoi il nous est apparu important de mettre au point une méthode permettant d'évaluer rapidement le statut physiologique des cellules d'*A. minutum*.

Les impacts des micro-algues toxiques sur les bivalves sont très variés, peuvent intervenir à de nombreuses étapes du cycle de vie et affecter plusieurs fonctions, organes et tissus. Afin de prendre en compte les effets sur l'organisme à différents niveaux d'organisation biologique, nous avons donc choisi de mettre en place une approche intégrative pour étudier l'interaction *A. minutum* / *C. gigas*.





---

## **Chapitre 2 – Matériel et méthodes**

---



Les méthodologies ou protocoles décrits ci-dessous sont repris dans les différents articles proposés dans le chapitre 3 de ce document. Il y sera fait référence le cas échéant sous la forme : [article X, p. Y].

## 1. Condition physiologique d'*A. minutum*

Le premier objectif de cette étude était de mettre au point une méthode permettant d'évaluer rapidement le statut physiologique des cellules d'*A. minutum*. La question sous-jacente était : dans quel état physiologique sont les cellules d'une culture de micro-algues lorsqu'elles sont utilisées lors d'une expérimentation ?

La première étape a été de déterminer et de caractériser les différents états physiologiques des cellules en effectuant un tri des différentes populations cellulaires observées par cytométrie en flux. Par la suite, les modifications cellulaires et physiologiques d'*A. minutum* suite à divers stress et changements thermiques, mécaniques, chimiques et hydrodynamiques ont été évaluées en couplant la cytométrie en flux, la microscopie (visible et épi-fluorescence) et l'utilisation de marqueurs fluorescents. Chaque condition a été réalisée en triplicats. Les principales étapes des différentes expérimentations sont résumées ci-après. Pour plus de détails, se référer à la partie « Materials and methods » de l'article 1.

### 1.1. Cultures de micro-algues

Des cultures non-axéniques d'*A. minutum* (souche AM89BM) ont été cultivées en batch de 250 ml (pour les expérimentations *in vitro*) ou de 10 litres (pour les simulations de conditions expérimentales) dans de l'eau de mer filtrée et autoclavée, enrichie avec du milieu L1. Les cultures ont été maintenues 12 jours à  $16 \pm 1$  °C et  $100 \mu\text{mol photon.m}^2.\text{s}^{-1}$ , avec un cycle jour:nuit (12:12h). [article 1, p. 74]

### 1.2. Procédures d'exposition d'*A. minutum*

*A. minutum* a été exposé à différents types de stress :

– stress mécanique et thermique (Figure 7) : trois cultures d'*A. minutum* (âgées de 12 jours) ont été diluées à  $5000 \text{ cell.ml}^{-1}$  dans de l'eau de mer stérile, filtrée, enrichie avec du milieu L1 et distribuées dans 12 tubes de culture en plastique de 15 ml (quatre traitements en triplicats). Les traitements ont été : i) contrôle, maintenu à  $16^\circ\text{C}$  ; ii) trois centrifugations de 5 min à 2000 rpm (= 782 g) à  $16^\circ\text{C}$  (les cellules ont été remises en suspension après chaque centrifugation) ; iii) refroidissement des cellules en plaçant les tubes dans la glace durant 1 h ; iv) congélation des cellules durant 24 h à  $-20^\circ\text{C}$ . Après traitement, les tubes de culture ont été replacés dans les conditions de culture initiales. Deux aliquots de  $250 \mu\text{l}$  ont été prélevés dans chaque tube juste après traitement et après 1, 4, 7 et 14 jours, puis analysés comme décrit dans le paragraphe 1.3. [article 1, p. 75]

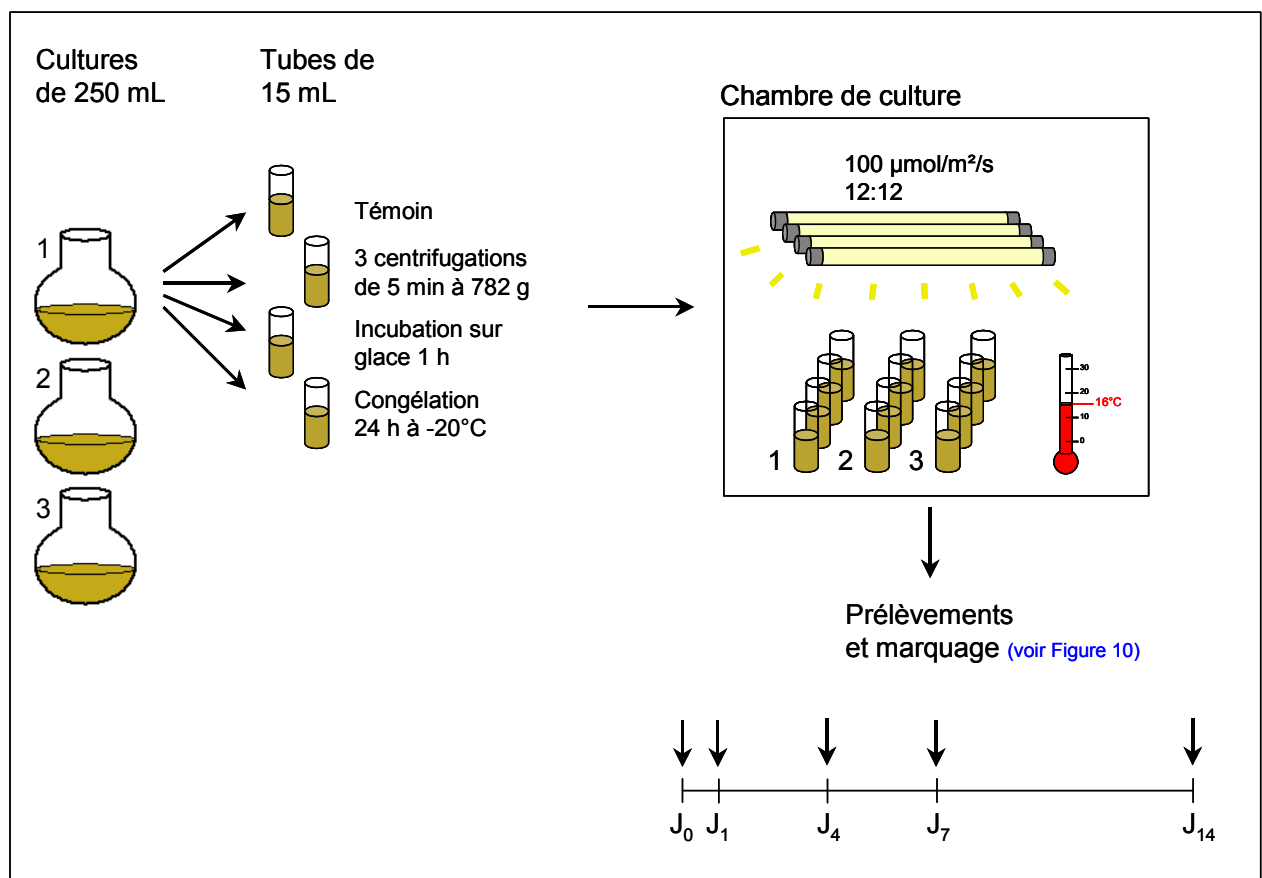


Figure 7 – Schéma résumant la procédure d'exposition de cultures d'*A. minutum* à des stress mécaniques et thermiques.

– stress chimique (Figure 8) : trois cultures d'*A. minutum* (âgées de 12 jours) ont été diluées à 15000 cell.mL<sup>-1</sup> dans de l'eau de mer stérile filtrée enrichie avec du milieu L1 et distribuées dans 33 tubes de culture en plastique de 15 ml (onze traitements en triplicats). Trois tubes ont été utilisés comme contrôles et les 30 autres ont été exposés à des concentrations croissantes de saponine (0,001 ; 0,005 ; 0,01 ; 0,05 et 0,1 g.L<sup>-1</sup> en concentration finale) et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,0015% ; 0,003% ; 0,015% ; 0,03% et 0,15% en concentration finale (% v/v)). Les tubes ont ensuite été maintenus dans le noir à 16°C pendant 30 minutes. Après incubation, deux aliquots de 250 µl ont été prélevés dans chaque tube, puis analysés comme décrit dans le paragraphe 1.3. [article 1, p. 75]

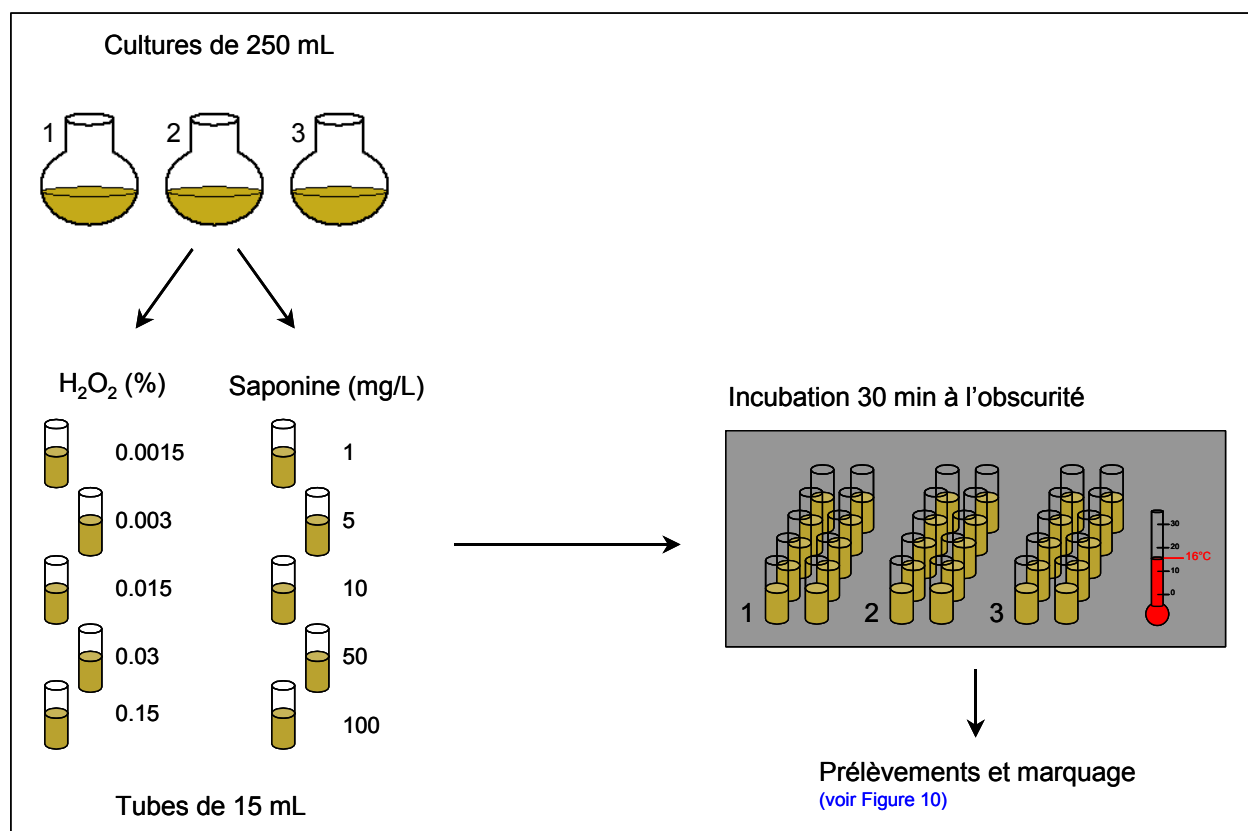


Figure 8 – Schéma résumant la procédure d'exposition de cultures d'*A. minutum* à des stress chimiques.

– simulation de conditions expérimentales (Figure 9) : les cultures d'*A. minutum* (âgées de 12 jours) ont été diluées à 5000 cell.ml<sup>-1</sup> dans de l'eau de mer filtrée à 0,5 µm et distribuées dans six bacs en plastique rectangulaires de 15 litres (deux traitements en triplicats). Trois bacs ont été homogénéisés avec un simple bullage placé au centre de chaque bac. Dans les trois autres, des pompes type « aquarium » ont été placées au centre des bacs afin de créer un courant vertical ascendant. Après avoir transféré les suspensions cellulaires d'*A. minutum* dans les bacs expérimentaux, deux aliquots de 250 µl ont été prélevés dans chaque bac juste après le transfert puis 1h, 2h, 3h, 6h et 24h après le début de l'expérimentation. Les aliquots ont été analysés comme décrit dans le paragraphe 1.3.

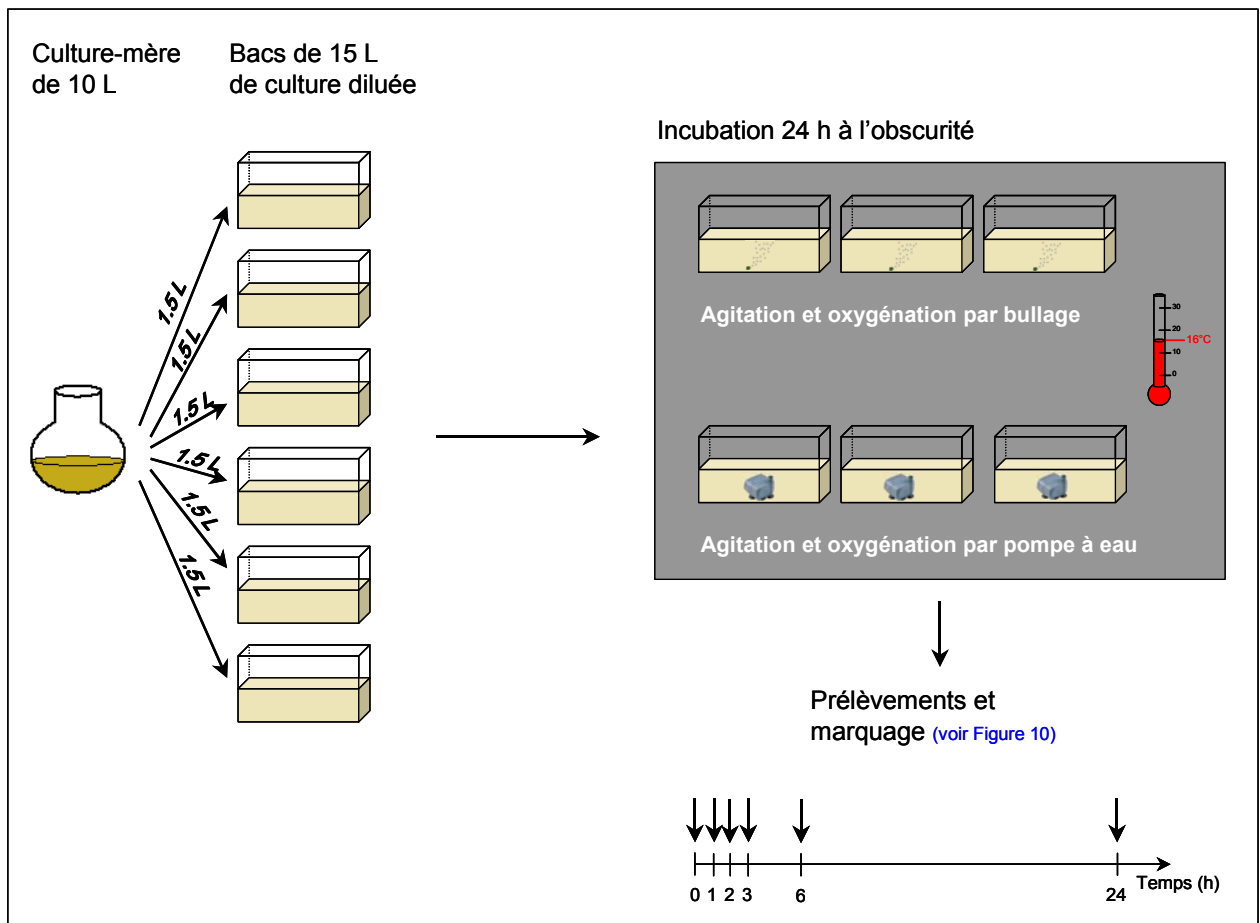


Figure 9 – Schéma résumant la procédure d'exposition de cultures d'*A. minutum* à une simulation de conditions expérimentales.

### 1.3. Mesure des paramètres cellulaires des micro-algues par cytométrie en flux

Chaque aliquot prélevé a été transféré dans un tube pour cytomètre en flux et marqué avec deux marqueurs spécifiques ADN/ARN : le SYBR-Green I (perméant des cellules mortes et vivantes) et le SYTOX-Green (perméant des cellules mortes uniquement). Les tubes ont ensuite été incubés dans le noir à 16°C durant 30 minutes avant d'être analysés par cytométrie en flux (Figure 10). Les paramètres cellulaires mesurés étaient : morphologiques (FSC assimilé à la taille des cellules et SSC assimilé à la complexité cellulaire) et de fluorescence (FL1 : fluorescence verte liée au marqueur cellulaire et FL3 : fluorescence rouge liée aux pigments chlorophylliens). [article 1, p. 74]

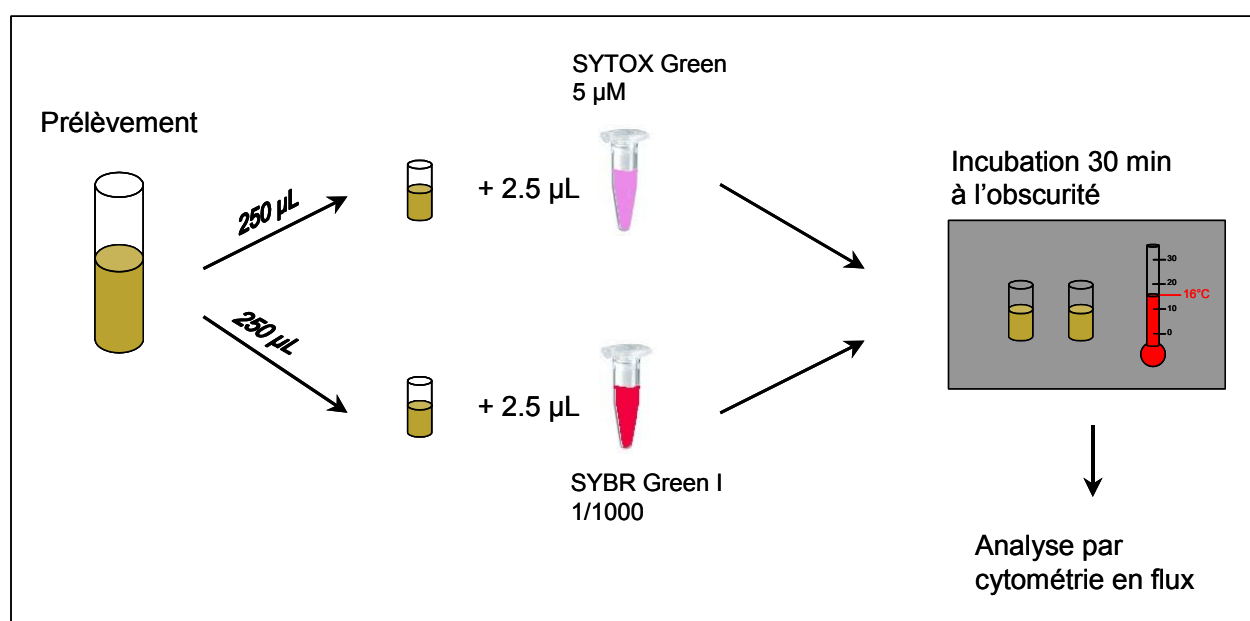


Figure 10 – Schéma résumant la procédure de marquage des cellules d'*A. minutum* avant analyse par cytométrie en flux.

### 1.4. Analyses statistiques

La normalité des données analysées a été vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Les différences entre conditions et l'évolution dans le temps ont été testées par des méthodes d'analyse de variance (ANOVA).

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel de statistiques Statgraphics Plus (Manugistics, Inc, Rockville, MD, USA). Les différences ont été considérées comme significatives lorsque la valeur de *p* était inférieure à 0,05.

[article 1, p. 76]





## 2. Exposition des huîtres *C. gigas* à *A. minutum*

Le second objectif de cette étude a été d'évaluer l'impact d'*A. minutum* sur *C. gigas* en mettant en place une approche intégrative afin de prendre en compte les effets sur l'organisme à différents niveaux d'organisation biologique ainsi que lors de différentes étapes du cycle de vie de l'huître. Cette approche a été mise en place pour tenter de répondre à deux questions principales :

- quels sont les impacts d'*A. minutum* sur la physiologie et le cycle biologique de *C. gigas* ?
- en quoi la physiologie de l'huître peut-elle influencer ces impacts, notamment en ce qui concerne l'accumulation de toxines ?

La première démarche expérimentale a consisté à exposer les huîtres à la micro-algue toxique et à enregistrer l'**activité valvaire** afin de mettre en évidence un éventuel changement de comportement. La seconde démarche expérimentale a également consisté à exposer les huîtres à *A. minutum*, puis à mesurer différents **paramètres physiologiques** au terme de l'exposition.

### 2.1. Matériel biologique

#### 2.1.1. Caractéristiques des huîtres

Les huîtres, *C. gigas*, utilisées lors des différentes expérimentations avaient les caractéristiques suivantes :

##### 2.1.1.1. Mesure de l'activité valvaire

- les huîtres utilisées lors des deux premières expérimentations ont été obtenues auprès d'une exploitation ostréicole de l'île de Kerner (Morbihan, France). Elles ont été choisies a priori en fonction de la taille de leur coquille :  $75 \pm 8$  mm de long,  $34,5 \pm 7,6$  g poids total (coquille + corps mou). [article 2 p. 88]

- les huîtres utilisées lors de la troisième expérimentation ont été obtenues auprès d'une exploitation ostréicole de la rade de Brest (Finistère, France). Elles ont été choisies a priori en fonction de la taille de leur coquille : 75 mm de long,  $40 \pm 1$  g poids total (coquille + corps mou). [article 3 p. 97]

##### 2.1.1.2. Mesure des paramètres physiologiques

- des huîtres diploïdes et triploïdes ont été utilisées lors des deux premières expérimentations. Elles ont été obtenues auprès d'une exploitation ostréicole de l'île de Kerner (Morbihan, France) et appartiennent au même stock commercial (âgées de 20-21 mois). Le poids sec du corps mou était de  $1,28 \pm 0,13$  g pour les diploïdes et de  $0,94 \pm 0,09$  g pour les triploïdes. [article 4 p. 109]

- les huîtres diploïdes utilisées lors de la troisième expérimentation ont été obtenues auprès d'une exploitation ostréicole de l'île de Kerner (Morbihan, France). Le poids total (coquille + corps mou) était de  $11,9 \pm 1,2$  g et la longueur de la coquille de  $62,6 \pm 2,7$  mm. [article 5 p. 122]

L'indice de condition est mesuré selon la formule : (poids sec du corps mou / poids sec de la coquille) x 100. [article 4 p. 109]

### 2.1.2. Cultures de micro-algues

Les micro-algues utilisées au cours des différentes expérimentations (*Alexandrium minutum* souche AM89BM et *Heterocapsa triquetra* souche HT99PZ) ont été cultivées dans de l'eau de mer filtrée (1 µm) stérile, enrichie avec du milieu L1, dans des ballons de culture de volume 1 à 10 litres, à une température de 16°C, à 100 µmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> avec une photopériode de 12:12h.

Pour les expérimentations concernant les paramètres physiologiques de l'huître, la micro-algue de fourrage, *T.Iso* (*Isochrysis galbana* clone Thaïtian), a été fournie par l'écloserie d'Argenton (Ifremer – France).

[article 2 p. 88, article 3 p. 96, article 4 p. 109, article 5 p. 122]

## 2.2. Procédures d'exposition des huîtres à *A. minutum*

Les huîtres ont été exposées à *A. minutum* au cours de différentes expérimentations afin d'évaluer l'impact 1) sur l'activité valvaire, 2) sur plusieurs fonctions physiologiques et étapes du cycle de vie de *C. gigas*. [article 2 p. 88, article 3 p. 96, article 4 p. 109, article 5 p. 122]

### 2.2.1. Mesure de l'activité valvaire

L'impact d'*A. minutum* sur l'activité valvaire de l'huître creuse, *C. gigas*, a été évalué au cours de quatre expérimentations. Les protocoles expérimentaux sont résumés ci-après. Seules trois de ces expérimentations sont présentées dans le présent manuscrit.

Les deux premières expérimentations (Figure 11 et Figure 12) ont utilisé un seul valvomètre, soit 16 huîtres suivies simultanément [article 2 p. 88].

La première expérimentation (Figure 11) s'est déroulée sur 17 jours : 10 jours d'acclimatation (huîtres nourries exclusivement avec *T.Iso*) et 7 jours d'exposition (un lot témoin nourri avec *T.Iso* et un lot exposé à *A. minutum*).

La seconde expérimentation (Figure 12) s'est déroulée sur 30 jours : 10 jours d'acclimatation (huîtres nourries exclusivement avec *T.Iso*), 7 jours d'exposition (un lot témoin nourri avec *H. triquetra* et un lot exposé à *A. minutum*) et 13 jours de dépuración (huîtres nourries exclusivement avec *H. triquetra*).

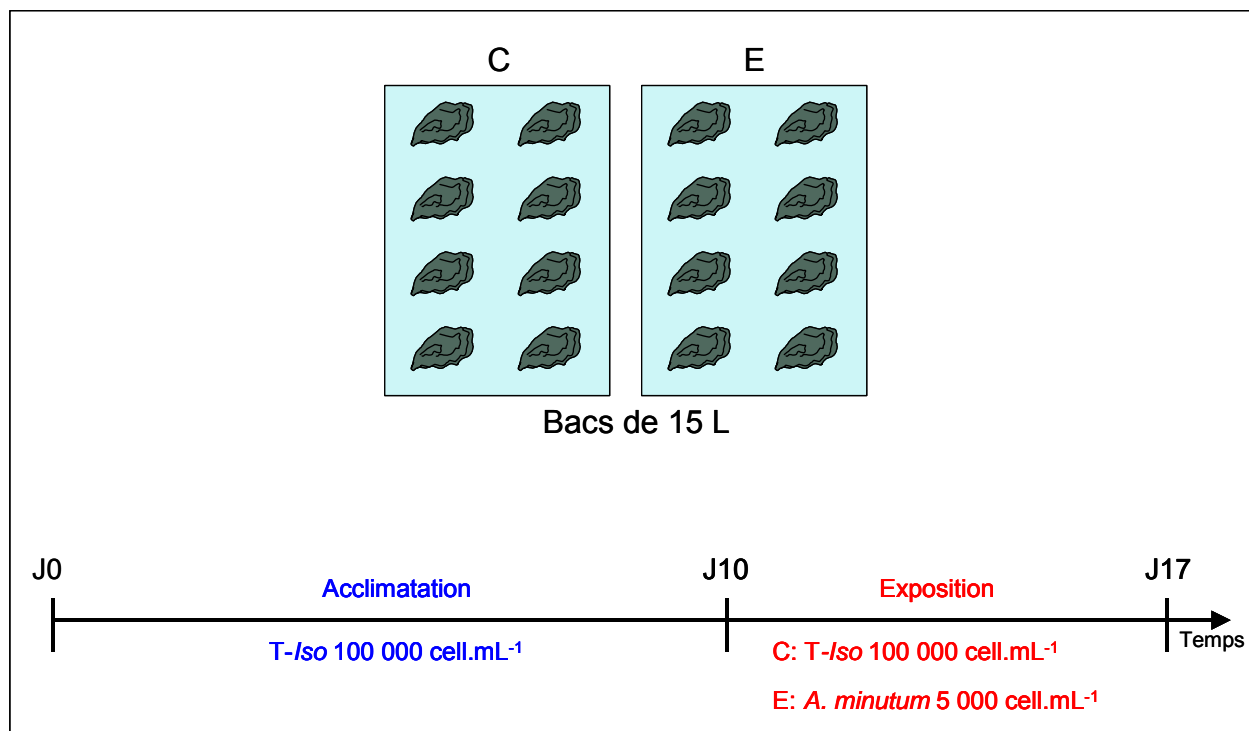


Figure 11 – Schéma résumant la procédure de la première expérimentation de suivi de l'activité valvaire de *C. gigas* en présence d'*A. minutum*.

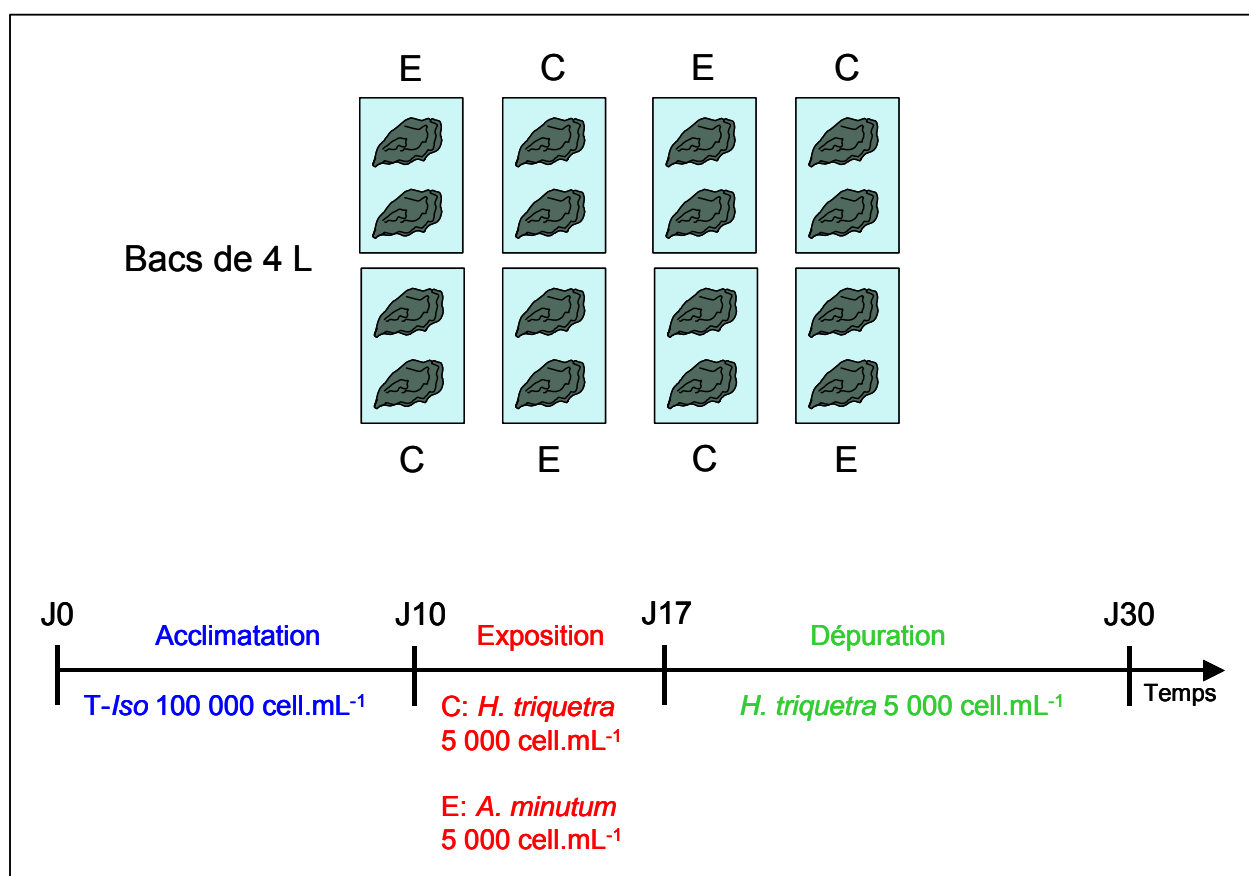


Figure 12 – Schéma résumant la procédure de la deuxième expérimentation de suivi de l'activité valvaire de *C. gigas* en présence d'*A. minutum*.

La troisième expérimentation (Figure 13) a utilisé deux valvomètres, soit 32 huîtres suivies simultanément [article 3 p. 96]. Elle s'est déroulée sur 15 jours : 10 jours d'acclimatation (huîtres nourries exclusivement avec *H. triquetra*) et 5 jours d'exposition (un lot témoin nourri avec *H. triquetra* et 3 lots exposés à des concentrations croissantes d'*A. minutum*). Au terme de la phase d'exposition, les toxines accumulées par les huîtres ont été quantifiées afin de mettre en évidence un éventuel lien entre le comportement des huîtres et l'accumulation des toxines.

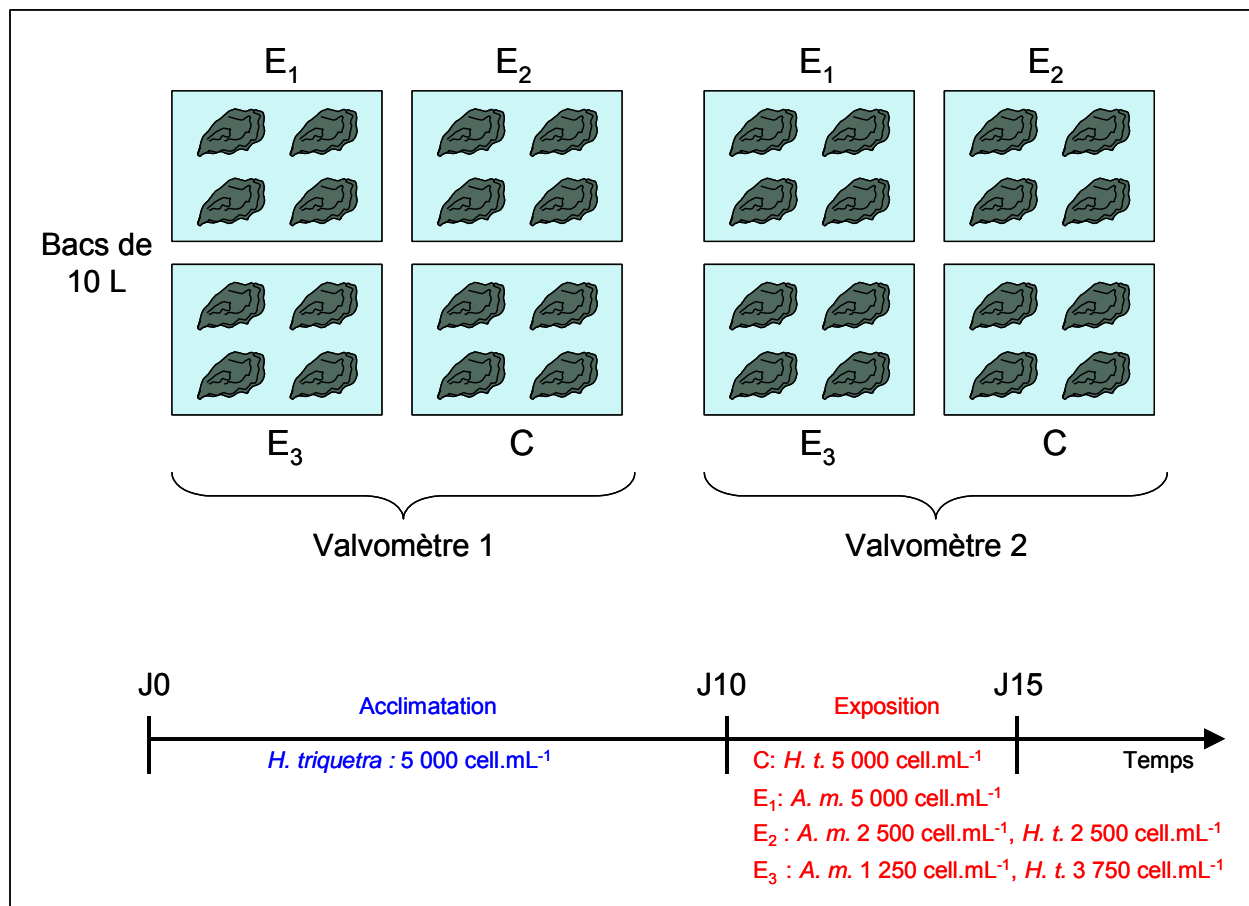


Figure 13 – Schéma résumant la procédure de la troisième expérimentation de suivi de l'activité valvaire de *C. gigas* en présence d'*A. minutum* (A.m.).

## 2.2.2. Mesure des paramètres physiologiques

L'impact d'*A. minutum* sur différents aspects de la physiologie de l'huître creuse, *C. gigas*, a été évalué au cours de quatre expérimentations. Seules trois d'entre elles sont détaillées dans le présent manuscrit. Avant chaque exposition, les huîtres ont été acclimatées et nourries avec une suspension de *T.Iso* durant dix jours.

### 2.2.2.1. Conditions expérimentales

Les deux premières expérimentations se sont déroulées en avril et mai 2007. Deux variables indépendantes (soit quatre conditions) ont été testées : la ploïdie (huîtres diploïdes vs triploïdes) et la micro-algue à laquelle les huîtres ont été exposées (*T.Iso* vs *A. minutum*). Chaque condition a été réalisée en triplicats (Tableau 3). [article 4 p. 109]

Tableau 3 – Récapitulatif des variables indépendantes lors des deux premières expérimentations

Micro-algues	Huîtres	
	Diploïdes	Triploïdes
<i>A. minutum</i> 5 000 cell.ml <sup>-1</sup>	3 réplicats de 10 huîtres	3 réplicats de 10 huîtres
<i>T.Iso</i> 500 000 cell.ml <sup>-1</sup>	3 réplicats de 10 huîtres	3 réplicats de 10 huîtres

La troisième expérimentation s'est déroulée en juin 2008 et testait une seule variable indépendante (soit deux conditions), à savoir la micro-algue à laquelle des huîtres diploïdes ont été exposées (*T.Iso* vs *A. minutum*). Chaque condition a été réalisée en triplicats (Tableau 4). [article 5 p. 122]

Tableau 4 – Récapitulatif des variables indépendantes lors de la troisième expérimentation

Micro-algues	Huîtres diploïdes
<i>A. minutum</i> 5 000 cell.ml <sup>-1</sup>	3 réplicats de 20 huîtres
<i>T.Iso</i> 500 000 cell.ml <sup>-1</sup>	3 réplicats de 20 huîtres

#### 2.2.2.2. Plan d'échantillonnage

Lors des deux premières expérimentations, au terme de l'exposition (quatre jours) les huîtres ont été réparties entre les différentes analyses (Figure 14) : contenus en toxines et en lipides de réserve de la glande digestive et activité de l'amylase, paramètres hématocytaires et humoraux. [article 4 p. 109]

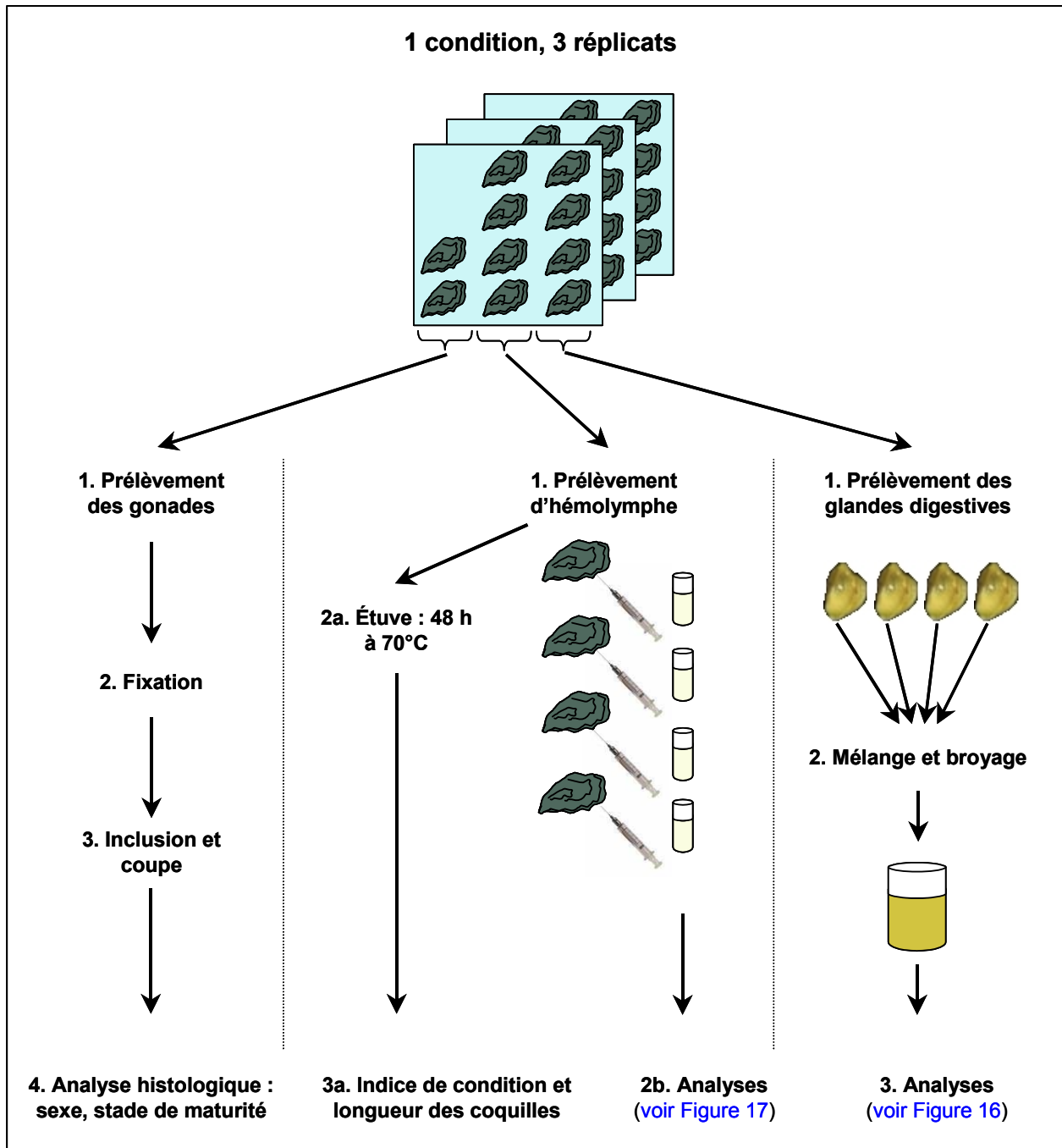


Figure 14 – Schéma résumant le plan d'échantillonnage ainsi que les analyses effectuées au terme de l'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* lors des deux premières expérimentations.

Lors de la troisième expérimentation, au terme de l'exposition (quatre jours) les mêmes analyses que précédemment ont été effectuées et trois ont été ajoutées (Figure 15) : la quantification des lipides polaires dans la glande digestive, l'observation histologique de différents tissus et la qualité des spermatozoïdes produits par les huîtres (Figure 15). Des ajustements ont également été effectués au niveau des quantités de tissus utilisées pour les différentes analyses. [article 5 p. 123]

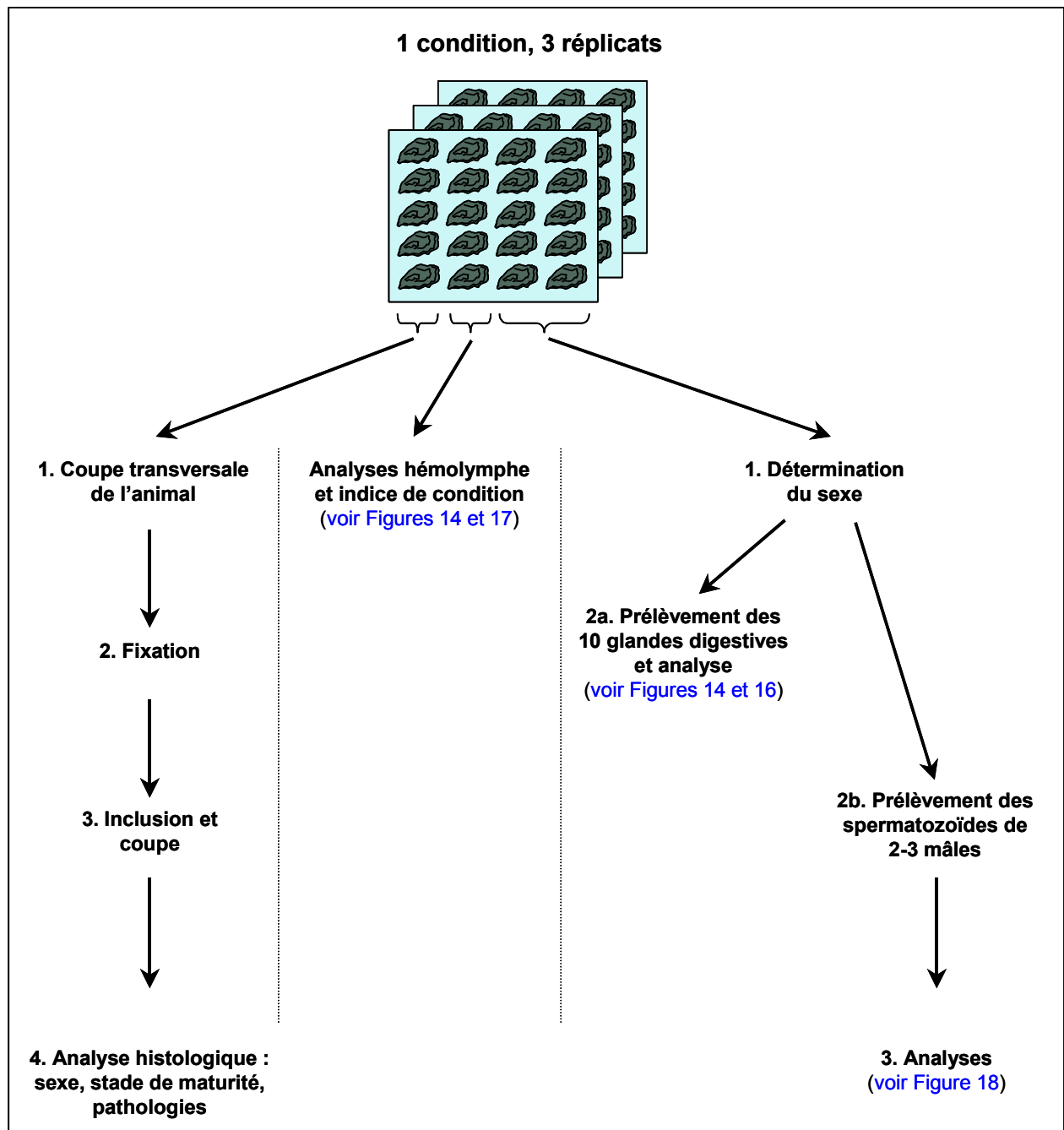


Figure 15 – Schéma résumant le plan d'échantillonnage ainsi que les analyses effectuées au terme de l'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* lors de la troisième expérimentation.

## 2.3. Paramètres mesurés

### 2.3.1. Dénombrement des micro-algues

Des mesures de concentrations cellulaires en micro-algues ont été effectuées lors des expérimentations de suivi de l'activité valvaire. Pour cela des échantillons ont été prélevés et fixés au formol (3% en concentration finale). Les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux. [article 2 p. 88, article 3 p. 97]



### 2.3.2. Mesure de l'activité valvaire

La mesure de l'activité valvaire des huîtres a été réalisée au moyen d'un valvomètre : deux électrodes, collées en vis-à-vis sur chacune des valves des huîtres, sont reliées à un valvomètre, qui transforme le signal, lui-même relié à un ordinateur qui permet l'acquisition et l'enregistrement des données. Cet appareillage permet de mesurer la distance entre les deux électrodes, donc entre les deux valves, et de suivre le comportement de l'huître. [article 2 p. 88, article 3 p. 97]

### 2.3.3. Histologie

Une coupe transversale d'une épaisseur d'environ 5 mm a été réalisée sur l'animal entier, en passant par la glande digestive, la gonade, le manteau et les branchies. Le muscle adducteur a été disséqué séparément. Les coupes ont été immédiatement immergées dans un fixateur (Davidson). Par la suite, elles ont été déshydratées et incluses dans de la paraffine. Des coupes de 5 µm ont ensuite été réalisées, montées sur des lames d'histologie et colorées. Les lames ont ensuite été observées sous microscope optique. [article 4 p. 109, article 5 p. 123]

### 2.3.4. Analyses effectuées sur la glande digestive

Le contenu en toxines, l'activité de l'amylase et le contenu en lipides ont été déterminés sur les glandes digestives prélevées (Figure 16). Celles-ci ont été congelées dans l'azote liquide juste après dissection, broyées dans l'azote liquide, puis conservées à -80°C jusqu'à analyse.

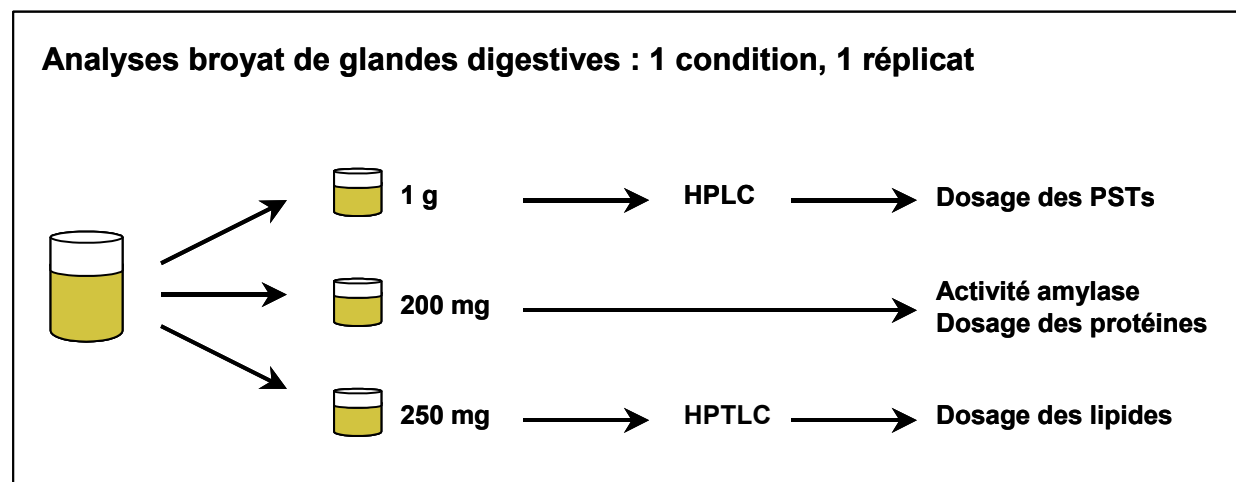


Figure 16 – Schéma résumant les analyses effectuées sur la glande digestive.

#### 2.3.4.1. Toxines

Les toxines ont été extraites et stabilisées à partir du broyat de glande digestive par de l'acide chlorhydrique (pH final inférieur à 3) et conservées à 4°C. Les extraits ont été ultra-filtrés avant d'être analysés par HPLC. [article 3 p. 97, article 4 p. 109, article 5 p. 123]

### 2.3.4.2. Lipides

Les lipides ont été extraits du broyat de glande digestive avec une solution de Folch (mélange méthanol-chloroforme) et analysés par une méthode de chromatographie couche mince à haute performance. Brièvement, l'extrait de glande digestive a été déposé sur une plaque de chromatographie et les composés lipidiques sont séparés par migration provoquée par un solvant. Les bandes ont été révélées par chauffage (à 160°C), la plaque a été scannée puis analysée par un logiciel approprié. [article 4 p. 109, article 5 p. 123]

### 2.3.4.3. Amylase

L'activité de l'amylase a été évaluée par une méthode d'hydrolyse de l'amidon (méthode colorimétrique). Brièvement, la vitesse de dégradation de l'amidon provoquée par l'extrait de glande digestive a été comparée à un control négatif (ne contenant pas d'extrait de glande digestive). L'activité spécifique de l'amylase a été évaluée par rapport au contenu en protéines de la glande digestive. Les protéines ont été quantifiées par un kit (BCA Protein Assay-Biorad). [article 4 p. 109, article 5 p. 124]

### 2.3.5. Mesure des paramètres immunitaires

Les paramètres immunitaires ont été mesurés sur l'hémolymphe prélevée au moyen d'une seringue au niveau du muscle adducteur des huîtres. Les principales étapes sont présentées schématiquement sur la Figure 17 et détaillées dans les paragraphes suivants.

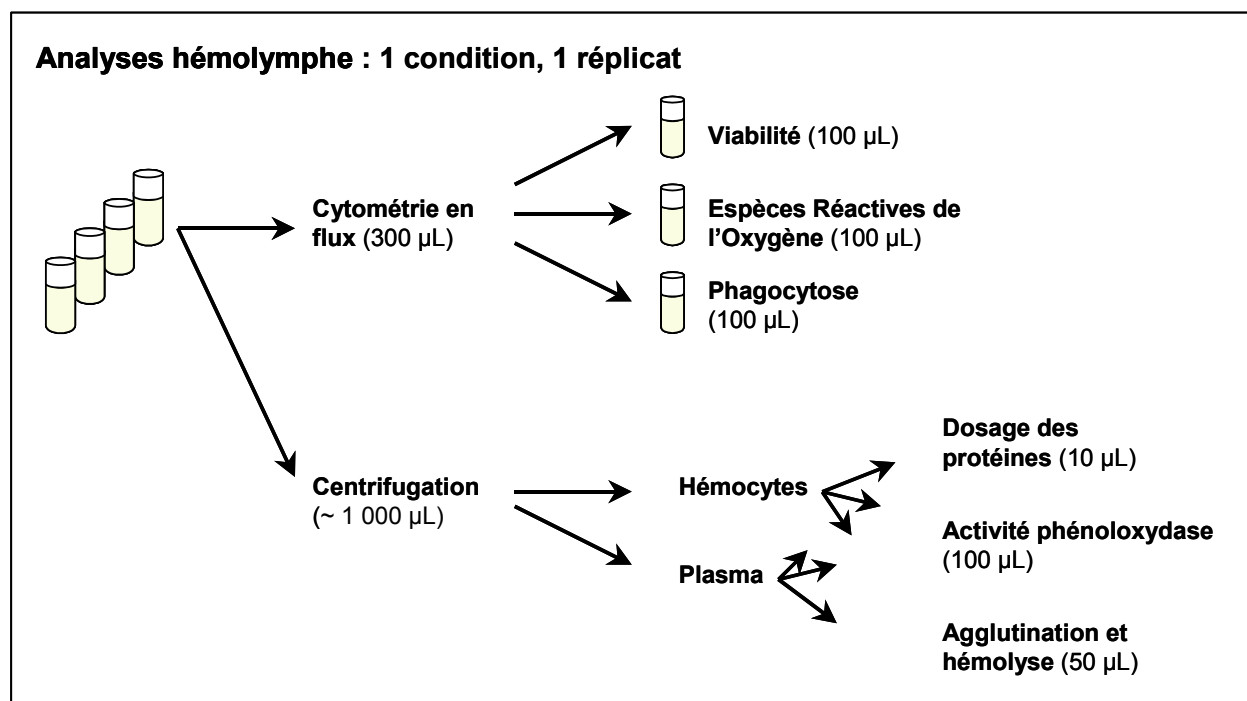


Figure 17 – Schéma résumant les paramètres hémocytaires et humoraux analysés.

### 2.3.5.1. Paramètres hématocytaires

Les paramètres hématocytaires ont été analysés par cytométrie en flux en utilisant des marqueurs fluorescents spécifiques. Les paramètres mesurés étaient la concentration, la viabilité, la production d'espèces réactives de l'oxygène et la capacité de phagocytose. [article 4 p. 110]

### 2.3.5.2. Activité de la phénoloxylase

L'activité de la phénoloxylase a été évaluée par une méthode de dégradation de la l-DOPA (méthode colorimétrique). Brièvement, la vitesse de dégradation de la l-DOPA, provoquée par une suspension d'hématocytes ou par le plasma, a été comparée à un contrôle négatif (ne contenant pas d'hématocytes ou de plasma). L'activité spécifique de la phénoloxylase a été évaluée par rapport au contenu en protéines des hématocytes ou du plasma. Les protéines ont été quantifiées au moyen d'un kit (BCA Protein Assay-Biorad). [article 4 p. 110]

### 2.3.5.3. Hémolyse et agglutination

Les titres d'hémolyse et d'agglutination ont été évalués sur des érythrocytes de sang de cheval. Brièvement, les érythrocytes de cheval ont été mis en présence des hématocytes ou du plasma à des concentrations décroissantes. Les titres ont été évalués en fonction de la dernière dilution pour laquelle apparaît une figure d'hémolyse ou d'agglutination. [article 4 p. 110]

### 2.3.6. Qualité des spermatozoïdes

La viabilité, le potentiel mitochondrial ainsi que le contenu en ADN des spermatozoïdes (Figure 18). ont été évalués par cytométrie en flux en utilisant des marqueurs fluorescents spécifiques. Le contenu cellulaire en ATP a été mesuré par une méthode de fluorimétrie au moyen d'un kit (ATPlite Luminescence Assay System, Perkin – Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek). La mobilité des spermatozoïdes a été estimée par des observations microscopiques. [article 5 p. 124]

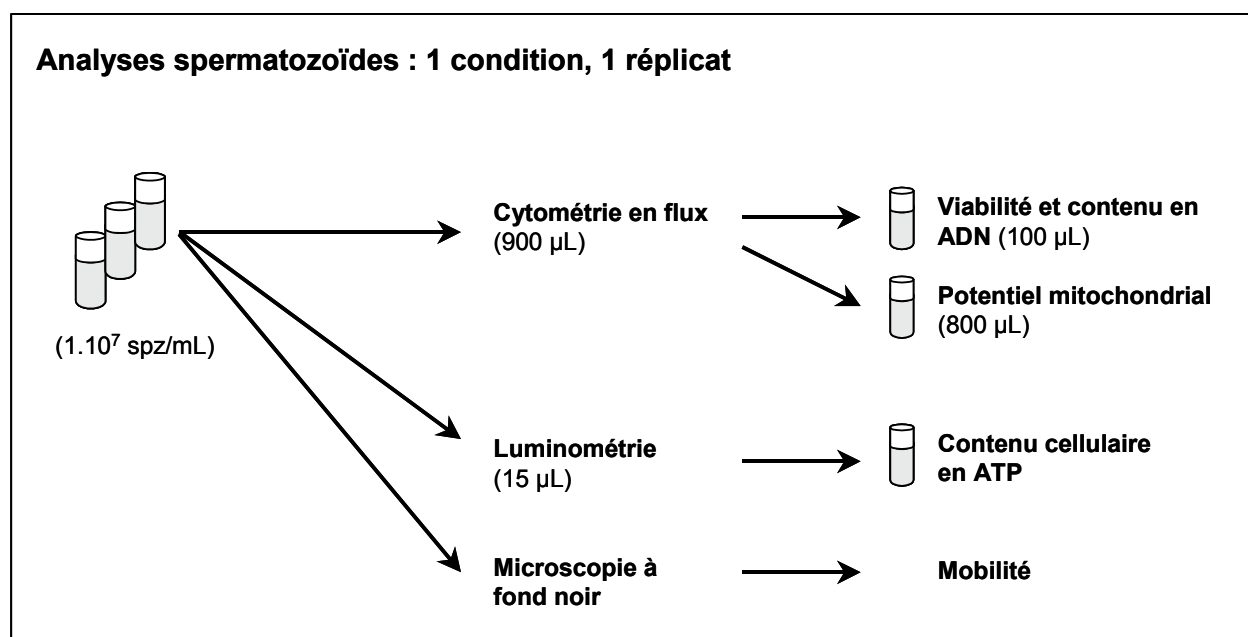


Figure 18 – Schéma résumant les paramètres analysés sur les spermatozoïdes.

## 2.4. Analyses statistiques

La normalité des données analysées a été vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Dans le cas où celles-ci respectaient une distribution normale des tests paramétriques ont été utilisés ; dans le cas contraire des tests non paramétriques ont été choisis pour analyser les données.

Les données exprimées en pourcentage ont été transformées en arcin(racine carrée) avant analyse statistique.

La comparaison de deux séries de données (ex. : comparaison de deux régimes alimentaires différents,...) a été effectuée par un test T dans le cas d'un test paramétrique et par un test U dans le cas d'un test non paramétrique.

La comparaison de séries de données (variables dépendantes) comprenant une ou plusieurs variables indépendantes a été effectuée par des méthodes d'analyse de variance (ANOVA).

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel de statistiques Statgraphics Plus (Manugistics, Inc, Rockville, MD, USA). Les différences ont été considérées comme significatives lorsque la valeur de p était inférieure à 0,05.

[article 2 p. 89, article 3 p. 97, article 4 p. 111, article 5 p. 124]



---

## **Chapitre 3 – Interaction *Alexandrium minutum* / *Crassostrea gigas***

---



# 1. Caractéristiques cellulaires d'*A. minutum* évaluées par cytométrie en flux

## 1.1. Introduction

La morphologie et la physiologie des micro-algues peuvent varier en fonction des conditions environnementales qu'elles rencontrent. Par exemple, certains dinoflagellés (notamment les dinoflagellés possédant une thèque) sont capables de former des kystes temporaires lorsque leurs conditions environnementales deviennent défavorables. Ces changements morphologiques et physiologiques pourraient influencer l'interaction des micro-algues avec d'autres organismes.

Dans le cadre de la présente étude, il nous est apparu important de développer une méthode permettant d'évaluer facilement et rapidement le statut des cultures d'*A. minutum* utilisées aux cours des différentes expérimentations. Le but était de déterminer si les changements de conditions subis par les micro-algues toxiques lors de leur utilisation au laboratoire, pouvaient avoir une conséquence sur leur morphologie et/ou leur physiologie. Les méthodes d'analyse retenues ont été la microscopie et la cytométrie en flux, couplés à l'utilisation de marqueurs fluorescents.





## 1.2. Article 1 – Flow cytometric measurements of cellular responses in a toxic dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, upon exposure to thermal, chemical and mechanical stresses.

Harmful Algae xxx (2011) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Harmful Algae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/hal](http://www.elsevier.com/locate/hal)



### Flow cytometric measurements of cellular responses in a toxic dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, upon exposure to thermal, chemical and mechanical stresses

Hansy Haberkorn<sup>a</sup>, Hélène Hégaret<sup>a</sup>, Dominique Marie<sup>b</sup>, Christophe Lambert<sup>a</sup>, Philippe Soudant<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

<sup>b</sup>UMPC Univ Paris 6 et CNRS, UMR7144, Station Biologique de Roscoff, Place G. Teissier, 29680 ROSCOFF, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 19 January 2011

Received in revised form 3 March 2011

Accepted 3 March 2011

##### Keywords:

*Alexandrium minutum*

Cysts

Flow cytometry

#### ABSTRACT

The purpose of the present study was to provide a flow-cytometric (FCM) approach evaluating *Alexandrium minutum* cellular responses to mechanical, thermal and chemical stresses. Coupling SYBR-Green I and SYTOX-Green staining, FCM analysis and sorting, and microscopic observations permitted identification and characterization of five cellular states/forms of *A. minutum*: (1) vegetative cells, (2) pellicle cysts, (3) degraded cells, (4) empty theca, and (5) dead cells. Storage on ice resulted in the transformation of a portion of vegetative cells into dead cells, pellicle cysts, and “degraded” cells; however, centrifugation resulted mostly in pellicle cysts and a few degraded cells. After these thermal and mechanical treatments, control and stressed cultures were monitored for 14 days. Stressed *A. minutum* cultures appeared to grow at the same rates as control cultures during the first seven days. During the last week of monitoring, however, cell densities of stressed cultures reached their stationary phase earlier than control cultures, suggesting incomplete recovery. Additional experiment assessing kinetics of excystment indicated that it can occur less than 9 h following mechanical stress (centrifugation) and that 75% of the culture can excyst within 24 h. Upon 30 min of exposure to chemical stressors (saponine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), only vegetative cells, pellicle cysts, and dead cells were detected. For both chemicals, excystment was dose-dependent. Counts of pellicle cysts increased with increasing saponine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration. Pellicle cysts were the most-predominant cell type at chemical treatments above 0.05 g L<sup>-1</sup> saponine and above 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Occurrence of dead cells appeared to follow an all-or-none response as dead-cell percentage increased from 3% at 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to 81% at 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> without pellicle cyst formation. Overall, excystment–excystment of *A. minutum* upon changes of environmental conditions can occur very rapidly but can be monitored using FCM and SYBR-Green I staining.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

#### 1. Introduction

The microalgal genus *Alexandrium* (Dinophyceae, Gonyaulacales) includes 29 described species (Figueroa et al., 2008). Nine *Alexandrium* species (including *A. catenella*, *A. minutum*, *A. fundyense*, *A. tamarense*) are known to produce paralytic shellfish toxins (PSTs) (Moestrup et al., 2002) and represent a risk for public health and a source of economic loss for aquaculture and fisheries in many coastal waters (Hoagland et al., 2002).

In the life cycle of dinoflagellates there are two forms of cysts: the sexual resting cysts and the asexual pellicle cysts. Sexual resting cysts (hypnozygotic) possess a double-layered wall and

require a mandatory dormancy period prior to germination. These resting cysts are thought to remain viable over extended exposures to adverse environmental conditions (Doucette et al., 1989). The pellicle cysts, also referred as temporary or ecdysal cysts, have a thin-layered wall and can germinate without a mandatory dormancy period (Anderson and Wall, 1978; Pfister and Anderson, 1987; Fistarol et al., 2004; Bravo et al., 2010). These temporary cysts are non-motile, surrounded by a pellicle, and are produced by vegetative cells shedding the theca (ecdysis) in response to short-term or sudden adverse conditions (Olli, 2004; Kremp and Parrow, 2006; Bravo et al., 2010).

At least 48 species of dinoflagellates have been reported to form thin-walled cysts as part of the life cycle, both in culture and in nature (Bravo et al., 2010). Formation of pellicle cysts can result from various physical, chemical or biological stresses or unfavorable conditions, including: changes in temperature (Grzebyk and

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 49 86 23; fax: +33 2 98 49 86 45.  
E-mail address: [soudant@univ-brest.fr](mailto:soudant@univ-brest.fr) (P. Soudant).

Berland, 1996), ageing of cultures (Jensen and Moestrup, 1997), nutrient stress (Anderson and Wall, 1978; Doucette et al., 1989), bacterial attack (Nagasaki et al., 2000), or allelopathic interactions (Fistarol et al., 2004). Pellicle cysts are thought to play a major role in dinoflagellate life cycles and population dynamics (Bolli et al., 2007). Formation of pellicle cysts is an effective strategy for surviving short-term environmental fluctuations, as pellicle cysts can quickly re-establish a vegetative, motile existence when conditions become favourable again (Anderson, 1998; Olli, 2004; Fistarol et al., 2004). Garcés et al. (1999) argued that a decrease in the motility of a population during a bloom, caused by physical disturbances (e.g. a wind event), could be compensated for by the revival of benthic, temporary cysts within 24 h. Pellicle cysts can also be formed during cell transit in the digestive tract of mussels and oysters (Laabir and Gentien, 1999; Laabir et al., 2007; Hégaret et al., 2008). It is believed that revival of temporary cysts can serve as a potential seed source for subsequent dinoflagellate blooms. Persson et al. (2006) demonstrated that eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed vegetative cells of toxic *A. fundyense* digested 72% of ingested cells, and 28% survived gut passage by forming temporary cysts. Hégaret et al. (2008) even demonstrated that culture of *A. fundyense* can be re-established from vegetative cells or temporary cysts, which survived bivalve gut passage.

Cell-counter and microscopic observations are the most widely used techniques to monitor morphology and growth of a microalgal culture. Several assays using flow cytometry (FCM) are now available to measure cell morphology and physiology of phytoplankton (Dubelaar and Jonker, 2000; Veldhuis and Kraay, 2000). FCM has been recognized to be useful for studies involving phytoplankton, such as assessing chemical toxicity to phytoplankton in the laboratory (Howlett and Avery, 1999; Franqueira et al., 2000; Lage et al., 2001; Stauber et al., 2002), in situ microcosm experiments (Stachowski-Haberkorn et al., 2008, 2009), or to monitor natural populations in the field (Marie et al., 1997; Rutten et al., 2005). Coupling FCM with the use of specific fluorescent dyes allowed access to specific cellular parameters and functions in phytoplankton. SYTOX-Green, a membrane impermeable DNA-binding dye, was shown to stain phytoplankton cells that have lost membrane integrity, thus assumed to be dead (Veldhuis et al., 1997; Marie et al., 2005). This dye was also used to evaluate phytoplankton viability following viral infection in laboratory experiments (Brussaard et al., 2001). More recently, SYTOX-Green was applied to assessment of the viability of resting cysts in dinoflagellate species (Binet and Stauber, 2006).

The objective of the present study was to characterize the different cell forms and viability of *A. minutum*, combining flow cytometry, microscopic observations, and fluorescent dyes (SYBR-Green I and SYTOX-Green). Various types of stresses (thermal, mechanical, and chemical) of varied intensities were also applied to *A. minutum* cultures to establish ranges of morphological and physiological responses. Cultures of *A. minutum* were exposed to (i) freezing, ice cooling and centrifugation and (ii) a gradient of saponine and  $H_2O_2$ . Thermal and mechanical treatments were designed to simulate various stresses that *A. minutum* could encounter during culture handling and/or bivalve filtration. The two tested chemicals aimed to “simulate” environmental chemical stresses (pollutant or natural) as both could compromise cell membrane integrity by two different mechanisms. The saponine is a surfactant that can disorganize the lipid bilayer membrane and solubilize proteins. Many detergents, natural or human activity related, can be encountered in coastal environment. The  $H_2O_2$  is an oxidizing agent which can compromise cell membranes by oxidizing lipids. Oxidant agents can be naturally present in seawater or can be produced by other organisms upon interaction with *Alexandrium* cells.

Although the methods presented was intended to compare *A. minutum* status in different experimental manipulations used to expose filter-feeders to this toxic dinoflagellate, they can also be used to assess the impact of various environmental factors (including pollutants) or common protocols used during laboratory studies (such as centrifugation, dilution, homogenization) on phytoplankton status.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Algal culture

Non-axenic cultures of *A. minutum* (strain AM89BM) were grown in 250-mL batch culture in L1 medium made with autoclaved, 1- $\mu$ m-filtered seawater (Guillard and Hargraves, 1993), for 12 days (exponential growth phase in our conditions) at  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  and 100  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , with a dark:light cycle of 12:12 h.

### 2.2. Flow-cytometric analyses

#### 2.2.1. SYTOX-Green and SYBR-Green I staining procedures

For each treatment and sampling time, two 250- $\mu$ L sub-samples were transferred into flow cytometer tubes and stained with two fluorescent DNA/RNA specific dyes. SYBR-Green I (Molecular probes, Eugene, OR, USA), that permeates both dead and live cells, was diluted in DMSO 10% and used at 1/1000 of the commercial solution. SYTOX-Green (Molecular probes, Eugene, OR, USA), that permeates membranes of dead cells only, was used at 0.05  $\mu\text{M}$  final concentration. Frozen cells (24 h at  $-20^\circ\text{C}$ ) were used as positive controls for SYTOX-Green staining (frozen cells were confirmed to be dead as no growth was observed after 14 days of culture). Thus, by counting the cells stained by SYTOX-Green it was possible to estimate the percentage of dead cells in each sample (Veldhuis et al., 2001). For both dyes, tubes were incubated in the dark at  $16^\circ\text{C}$  for 30 min before flow-cytometric analyses. SYBR-Green I and SYTOX-Green fluorescence were measured at 500–530 nm (green, FL1 detector) by flow-cytometry. Presence of chlorophyll pigments in *A. minutum* cells provided a “natural staining”. Their red chlorophyll fluorescence was measured at  $>650$  nm (red, FL3 detector) by flow-cytometry and was used to discriminate particles containing chlorophyll pigments.

#### 2.2.2. Measurement of *A. minutum* cell variables by flow cytometry

Counting and characterization of *A. minutum* forms and states were performed using a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometer (FCM) equipped with a 488 nm argon laser. The FL3 detector (red fluorescence,  $>650$  nm) was set with a threshold allowing only the detection of particles containing chlorophyll, thus assumed to be phytoplankton cells. Dinoflagellate cells were visualized on a Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC) cytogram, as well as on a red fluorescence (FL3, chlorophyll related) and green fluorescence (FL1, SYBR-Green I or SYTOX-Green related) cytogram. These “relative” morphometric and fluorometric variables (expressed in arbitrary units, AU) were used to characterize the different *A. minutum* forms and states. Counts were estimated from the flow-rate measurement of the flow-cytometer (Marie et al., 1999) as all samples were run for 1 min. Results were expressed as number of cells per mL.

#### 2.2.3. Identification of *A. minutum* subpopulations

A cell suspension of *A. minutum* was centrifuged three times for 5 min at 2000 rpm ( $\approx 800 \times g$ ) and  $16^\circ\text{C}$ . Twenty-four hours later, the suspension was used to identify *A. minutum* subpopulations. The suspension was stained with SYBR-Green I as described above (Section 2.2.1). Subpopulations of interest were gated and sorted by flow cytometry (FACSaria – Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) for microscopic identification and photography.

### 2.3. Microscopy

An epi-fluorescent, inverted microscope was used to identify and describe *A. minutum* cells, previously sorted with FCM. The inverted microscope (Leica DM IRB) was equipped with a mercury vapor lamp, two excitation filters (bandpass 450–490 nm > red and green fluorescence; bandpass 515–560 nm > red fluorescence), and a Q-IMAGING (RETIGA 2000R FAST 1394) camera plugged into a Personal Computer with Image-Pro 6.0 software (Media Cybernetic).

### 2.4. Experimental conditions

#### 2.4.1. Thermal and mechanical stresses

Three cultures of *A. minutum* (12 days old) were diluted to 5000 cells mL<sup>-1</sup> in filtered sterile sea water (FSSW) enriched with L1 medium and distributed into 12 15-mL plastic tubes (four treatments in triplicate). Treatments were: (i) control, maintained at 16 °C; (ii) centrifuged three times 5 min at 2000 rpm (=800 × g) and 16 °C (cells were resuspended after each centrifugation); (iii) cooled by setting tubes into an ice-bath for 1 h; (iv) frozen for 24 h at -20 °C.

After treatments, culture tubes were returned to previous culture conditions (16 ± 1 °C and 100 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, with a dark:light cycle of 12:12 h). Two 250-μL samples were taken from each tube just after treatments and after 1, 4, 7 and 14 days and analyzed as previously described (Section 2.2).

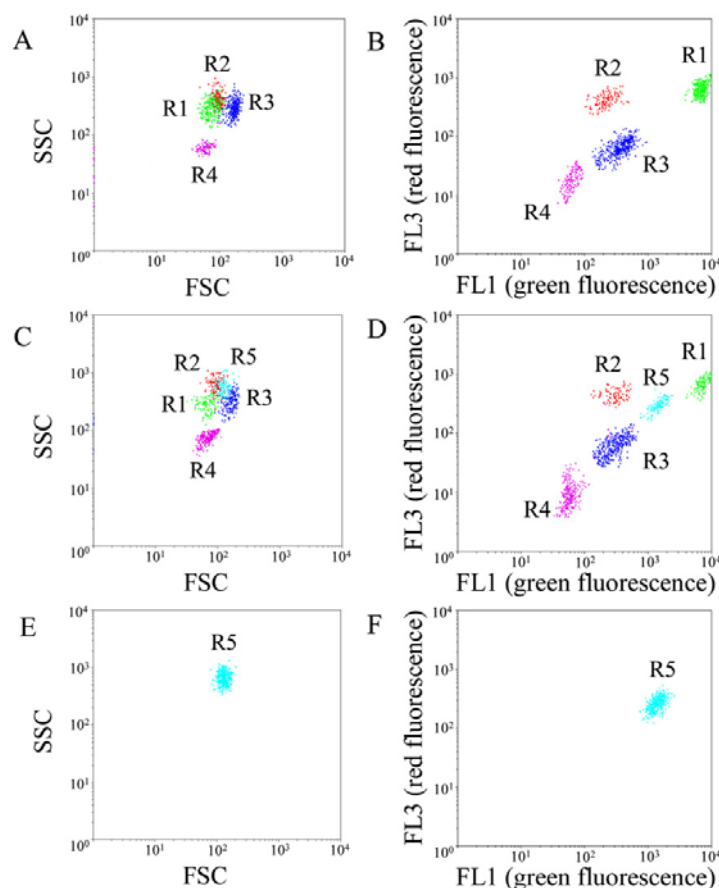
#### 2.4.2. Chemical stress

Three cultures of *A. minutum* (12 days old) were diluted to 15,000 cells mL<sup>-1</sup> with FSSW into 33 15-mL plastic tubes (11 treatments in triplicate). Three tubes were used as controls and the thirty remaining tubes were exposed to increasing concentrations of saponine (0.001, 0.005, 0.01, 0.05 and 0.1 g L<sup>-1</sup> as final concentrations) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.0015%, 0.003%, 0.015%, 0.03% and 0.15% as final concentrations, % v/v). Previous experiments were performed (data not shown) to determine the chemical concentrations allowing the observation of dose-dependent responses. All tubes were then maintained for 30 min in the dark at 16 °C. After incubation, two samples of 250 μL were taken from each tube and analyzed as described previously (Section 2.2).

#### 2.4.3. Time for excystment after mechanical stress

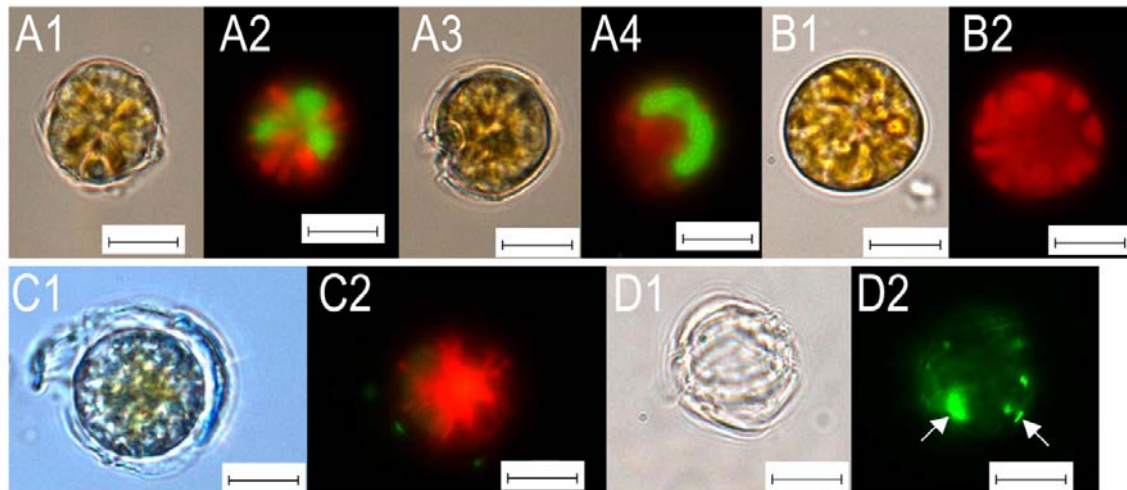
Ten-mL samples of cultures of *A. minutum* at a concentration of 85,000 cells mL<sup>-1</sup> were distributed into 12 15-mL plastic tubes (6 replicates of two treatments). Treatments were: (i) control, maintained at 16 °C; (ii) centrifuged three times 5 min at 2000 rpm (=800 × g) and 16 °C (cells were resuspended after each centrifugation).

After treatments, culture tubes were returned to previous culture conditions (16 ± 1 °C and 100 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, with a dark:light cycle of 12:12 h). Every 3 h, from 0 h to 24 h after the centrifugation, 300-μL samples were taken from each tube and



**Fig. 1.** SSC (Side Scatter)–FSC (Forward Scatter) cytogram (A, C and E) and FL3 (chlorophyll-related pigment red fluorescence)–FL1 (SYBR-Green I fluorescence) cytogram (B, D and F) of *A. minutum* cells after centrifugation (A and B), incubation one hour on ice (C and D), freezing 24 h at -20 °C (E and F) and staining with SYBR-Green I. R1: vegetative cells; R2: cysts; R3: degraded cells; R4: theca; R5: dead cells.





**Fig. 2.** *A. minutum* cells (A–D) under white light (A1, A3, B1, C1 and D1) as well as red and green fluorescent lights (A2, A4, B2, C2 and D2) after three centrifugations at  $800 \times g$  during 5 min. (A) Vegetative cells; (B) pellicle cysts; (C) degraded cells; (D) theca. Arrows indicate bacteria Scale bar =  $10 \mu\text{m}$ .

incubated for 30 min in the dark at  $16^\circ\text{C}$  with SYBR-Green I and analyzed with the flow cytometer to determine the percentage of temporary cysts.

### 2.5. Statistical analysis

In all experiments (thermal, mechanical and chemical stresses), statistical differences between conditions were analyzed by one way ANOVA after checking assumptions (normality and homoscedasticity of the error term). In thermal and mechanical stress experiments, time effect after exposure was also tested by one-way ANOVA. In the chemical-stress experiments, a linear model was used to correlate pellicle cysts and empty thecae. The fit between predicted and measured values was statistically tested using ANOVA. For all statistical results, a probability of  $p < 0.05$  was considered significant. Statistical analyses were performed using Statgraphics Plus (Manugistics, Inc, Rockville, MD, USA).

## 3. Results

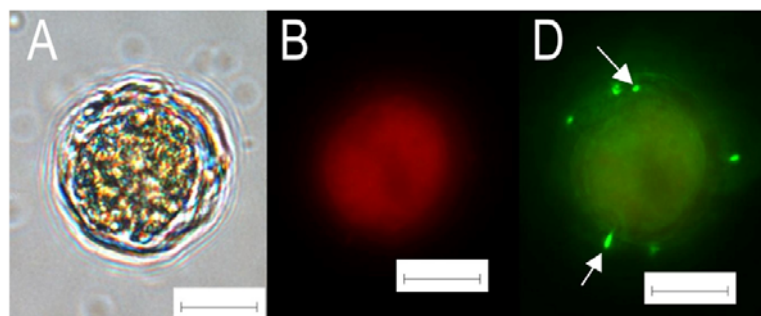
### 3.1. Identification and characterization of *A. minutum* cell states using SYBR-Green I staining

Five *A. minutum* forms/states were identified and characterized by coupling SYBR-Green I staining, FCM analysis and sorting, and microscopic observations. Fig. 1 presents FSC–SCC and FL1–FL3

characteristics of *A. minutum* cells 1 day after: centrifugation (Figs. 1A, B and 2), ice cooling (Fig. 1C and D), and freezing at  $-20^\circ\text{C}$  (Figs. 1E, F and 3). Five regions (Fig. 1B, D and F) were designated, identified with different colors, and used to sort *A. minutum* forms/states. Dead cells (R5, light blue dots, Fig. 1E and F) were not sorted because they constituted 100% of analyzed cells after freezing and were all positive with SYTOX-Green staining (data not shown).

Vegetative cells (R1, green dots in Fig. 1A–D) were characterized by high chlorophyll-pigment red fluorescence (FL3) and high SYBR-Green I fluorescence (FL1). Upon sorting, vegetative cells were still motile with normal shape and morphological characteristics (presence of theca and chloroplasts) (Fig. 2A1, 2A3). The nucleus was intensely stained by SYBR-Green I (Fig. 2A2 and 2A4), revealing a characteristic U-shaped nucleus in these cells (Fig. 2A4).

Pellicle cysts (R2, red dots in Fig. 1A–D) had very low SYBR-Green I fluorescence, suggesting that the dye did not penetrate the cells. Chlorophyll I (red fluorescence, FL3) was high but lower (about 35% less) than in vegetative cells (Fig. 1B and D). FSC and SCC values of pellicle cysts were higher than those of vegetative cells (Fig. 1B and D). Identification of pellicle cysts was further confirmed after FCM sorting and microscopic observations (Fig. 2B). Cells were immotile (loss of flagella), athecate (absence of theca), and round with chloroplasts (Fig. 2B1). The nucleus was not stained by SYBR-Green I (Fig. 2B2), even after several hours of incubation (data not shown).



**Fig. 3.** Dead *A. minutum* cells (A, B and C) under white light (A), red fluorescent light (B) as well as red and green fluorescent light (C) after freezing (24 h at  $-20^\circ\text{C}$ ). Arrows indicate bacteria Scale bar =  $10 \mu\text{m}$ .

Degraded cells (R3, dark blue dots in Fig. 1A–D) were characterized by low chlorophyll fluorescence (FL3) and low SYBR-Green I fluorescence (FL1). Mean FSC was about twice that of vegetative cells, but SCC was only slightly higher. Degraded cells were found to be immotile upon FCM sorting. Thecae were still present but appeared damaged (Fig. 2C1). Microscopic observations (Fig. 2C) revealed that chloroplasts or chlorophyll pigments migrated towards the center of the cell, resulting into a star-shaped red fluorescence pattern. Green fluorescence of SYBR-Green I appeared to be diffuse with some green dots in the cells, and did not show the characteristic U-shaped nucleus (Fig. 2C2). Green rods and cocci, revealed by SYBR-Green I staining (white arrows), were likely bacteria associated with thecae.

Empty thecae (R4, pink-purple dots in Fig. 1A–D) were characterized by very low FL3 fluorescence and low FL1 fluorescence. After sorting, microscopic observations revealed a transparent, empty theca (Fig. 2D1). Bacteria, revealed by SYBR-Green I staining, were found stuck to the surface of thecae (white arrows, Fig. 2D2).

Freezing (24 h at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) the culture resulted in 100% dead cells, all found to be permeable to SYTOX-Green. No growth in frozen cultures was observed for the following 14 days (Fig. 4A). Dead cells (R5, light blue dots in Fig. 1C–F), were characterized by high chlorophyll (red fluorescence, FL3), although half that of live, vegetative cells. Mean SYBR-Green I fluorescence (FL1) was about five times lower than that of live vegetative cells. Microscopic observations (Fig. 3) of dead *A. minutum* cells revealed that SYBR-Green I fluorescence was diffused throughout the entire cell (very different from the U-shaped nucleus observed in vegetative cells, Fig. 3C) and that red fluorescence (chlorophyll) appeared to be diffuse (Fig. 3B). Thus, nucleus and chloroplast structures were not visible in dead cells (Fig. 3). The presence of green fluorescent particles (white arrows) surrounding dead cells (Fig. 2C) incubated with revealed the presence of bacteria (detected by the FL1 detector of the flow cytometer).

### 3.2. Monitoring of cultures exposed to short term mechanical and thermal stresses

Cellular modifications of *A. minutum* observed upon mechanical and thermal stresses were monitored for 14 days after the stress.

Fig. 4 presents counts of live cells (A), percentages of dead cells (B), and red chlorophyll fluorescence (C) in cultures subjected to (i) 24 h  $-20^{\circ}\text{C}$  freezing, (ii), 1 h ice cooling and (iii), centrifugation three times for 5 min at 800 g and (vi) control culture.

Ice cooling killed approximately 30% of *A. minutum* cells. Dead cells were still detected 1 day after stress but had reduced chlorophyll fluorescence (Fig. 4C). After 4 days, the mean percentage of dead cells decreased steadily to 3% at day 14. Percentages of dead cells in centrifuged and control cultures were less than 1% from 0 to 7 days after the stress (Fig. 4B). On day 14, however, control and centrifuged treatments showed significant increases in percentages of dead cells (2.3% and 4.8%, respectively) as compared to previous days.

Four days after the stress, cell division was observed in centrifuged, ice cooled, and control cultures, reaching  $16 \times 10^3$ ,  $10 \times 10^3$  and  $15 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Cell counts in ice-cooled cultures were lower than those of centrifuged and control cultures until day 4 ( $p < 0.05$ ). After 7 and 14 days of monitoring, cell densities in centrifuged and ice cooled cultures were similar, but significantly lower than those of control cultures (about  $-20\%$  at day 14,  $p < 0.05$ ). After 7 days, centrifuged culture had a higher percentage of cysts (53%) than ice-cooled and control cultures (35% and 36%, respectively; ANOVA,  $p < 0.05$ ). Percentage of cysts remained quite stable in centrifuged and ice-cooled cultures after 14 days of culture (58% and 32%, respectively) but more than in

control culture (less than 19%). As all *A. minutum* cells were dead in the frozen treatment, presence and occurrence of cysts were not monitored.

After freeze-killing and ice-cooling *A. minutum* cells, chlorophyll fluorescence in dead cells decreased steadily during the 14 days (Fig. 4C). In the other conditions (ice cooled, centrifuged, control), the red fluorescence in live cells increased from day 0 until day 4 and then returned to initial values by day 14 (Fig. 4C).

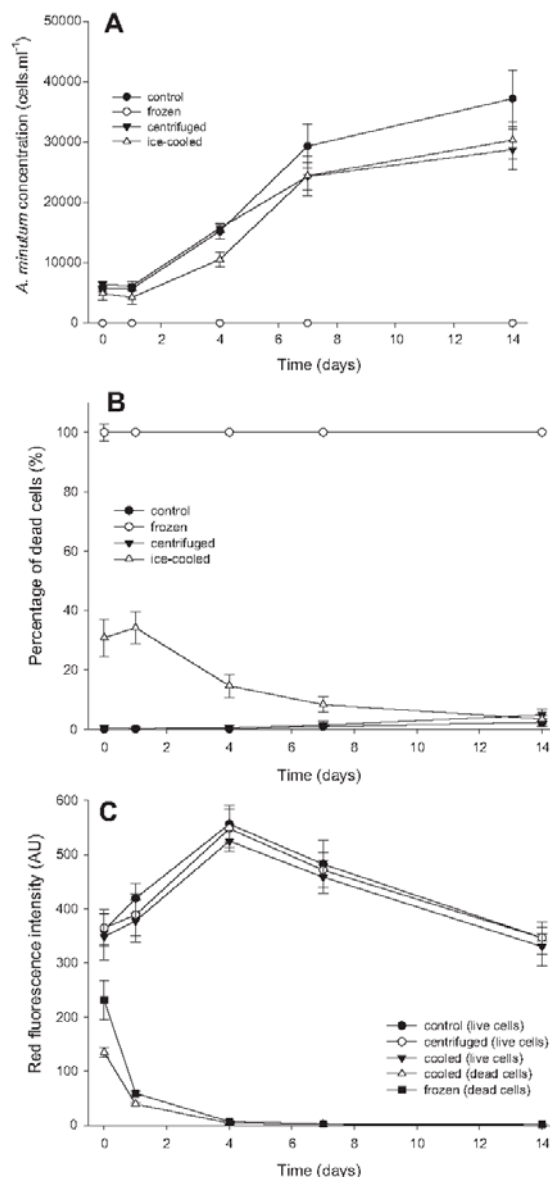
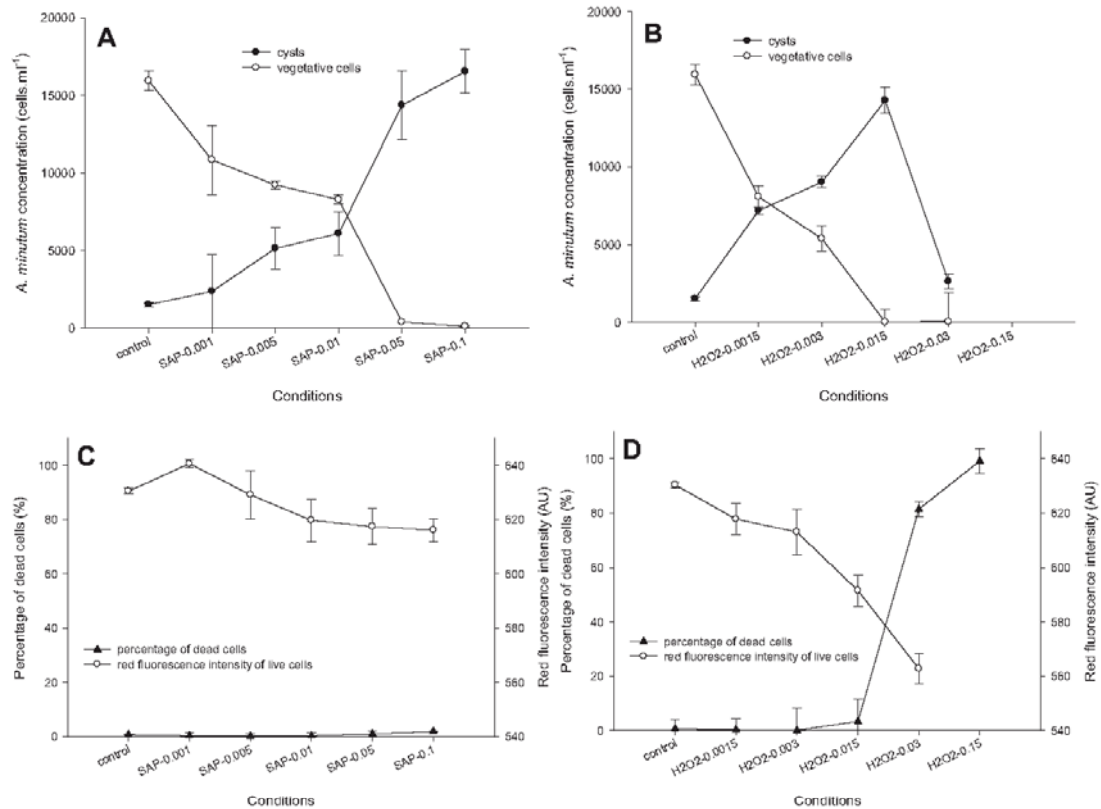


Fig. 4. (A) Changes in *A. minutum* cell concentration during 14 days in control, freezing, centrifugation and ice-cooling conditions after SYTOX-Green staining. (B) Changes in *A. minutum* dead cell concentration during 14 days in control, freezing, centrifugation and ice-cooling conditions after SYTOX-Green staining. (C) Changes in *A. minutum* red fluorescence intensity during 14 days in control live cells, centrifuged live cells, ice-cooled live cells and frozen dead cells after SYTOX-Green staining. Results are expressed as mean  $\pm$  CI with  $n = 3$ .



**Fig. 5.** Effect of 1 h incubation with increasing concentrations of saponine (A, C) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B, D) on *A. minutum* cyst and vegetative cell concentrations after SYBR-Green I staining (A, B) and on the percentage of dead cells and red fluorescence intensity of *A. minutum* cells after SYTOX-Green staining (C, D). Results are expressed as mean  $\pm$  CI with  $n = 3$ .

### 3.3. Cellular responses to chemical treatments

In controls, there was a large majority of vegetative cells (91%), 9% of pellicle cysts, and no dead cells (Fig. 5).

Upon increasing the concentration of saponine, counts of vegetative cells gradually decreased while pellicle cysts concomitantly increased (Fig. 5A). All vegetative cells were transformed in pellicle cysts when saponine concentration was above 0.05 g L<sup>-1</sup>. However, even at the highest concentration of saponine, no dead cells were detected using SYTOX-Green staining (Fig. 5C).

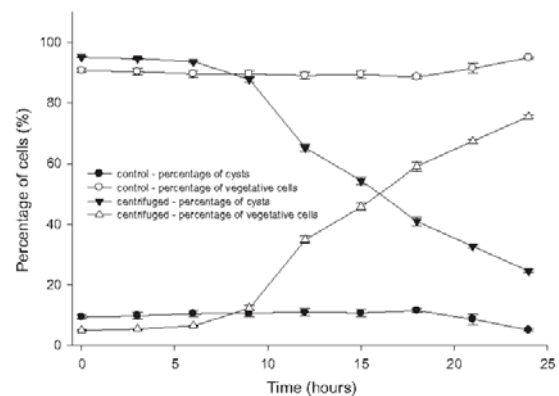
Counts of vegetative cells steadily decreased when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration increased (Fig. 5B). All vegetative cells were replaced by pellicle cysts when the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration reached 0.015%. Above this concentration, the percentage of dead cells increased rapidly to reach 82% and 99% of total cells when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were 0.03% and 0.15%, respectively (Fig. 5D).

In both experiments, counts of empty thecae increased concomitantly along with concentration of pellicle cysts. Very good correlations ( $R^2 = 0.97$ ,  $p < 0.0001$ ) were obtained between pellicle cysts and empty thecae when combining the saponine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiments. Empty thecae resulting from cell death were also found at highest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations.

### 3.4. Excystment of *A. minutum* after mechanical stress

Results of this experiment indicated that pellicle cysts of *A. minutum* were able to excyst in less than 24 h. No significant difference in the percentage of pellicle cysts was observed from 0

to 6 h after centrifugation. After 9 h, the percentage of pellicle cysts decreased significantly every 3 h for the rest of the experiment, down to 24.5%, 24 h after centrifugation (Fig. 6). The total cell counts did not increase, thereby identifying that excystment, and not growth of the remaining vegetative cells was responsible for the increasing percentage of vegetative cells.



**Fig. 6.** Percentages of *A. minutum* cysts and vegetative cells after SYBR-Green I staining over a 24 h time period, after three centrifugations at 800  $\times$  g, compared to a non-centrifuged control. Results are expressed as mean  $\pm$  CI with  $n = 6$ .



#### 4. Discussion

##### 4.1. Cysts formation in *A. minutum* and detection by flow cytometry

To survive through unfavorable environmental conditions, dinoflagellates can form resting and pellicle cysts. The resting cysts (or hypnecysts) are formed through a complex sexual process. They are surrounded by persistent cell wall, and require a mandatory dormancy period prior to germination (Garcés et al., 1998). Pellicle cysts, also called ecdysal or temporary cysts, are formed from vegetative cells by shedding theca (ecdysis) and do not require a mandatory dormancy period (Olli, 2004; Figueroa and Bravo, 2005; Figueroa et al., 2005, 2008; Bravo et al., 2010).

In the present study, pellicle cysts were shown to be impermeable to SYBR-Green I, a cell permeant dye. During formation of pellicle cysts, armored dinoflagellate cells undergo a process termed ecdysis during which the cell covering (including plasma membranes, outer amphiesmal vesicle membranes and thecal plates) is shed and immediately followed by the transformation of the cell into a non-motile cyst covered by a single-layered wall or pellicle (Sekida et al., 2001). The low permeability of this pellicle was previously demonstrated (Montresor, 1995; Garcés et al., 1998), thus explaining why pellicle cysts of *A. minutum* were impermeable to SYBR-Green I in our conditions.

Red fluorescence measured by flow cytometry of pellicle cysts was only reduced by about 20–30% compared to vegetative cells, suggesting that chlorophyll pigments remained fairly intact. Microscopic observations of pellicle cysts confirmed that chloroplasts and chlorophyll pigments were not degraded and little modified upon encystment. Indeed, such pellicle cysts are known to remain fully metabolically active (Taylor, 1987).

Concomitant with the formation of pellicle cysts, empty thecae were found in the culture. Empty thecae were detected by flow cytometry because of SYBR-Green I stained bacteria present on the surface of thecae. Microscopic observations confirmed the presence of bacteria associated with empty thecae of *A. minutum*. SYBR-Green I stained bacteria were also observed on the surface of degraded and dead cells. Biegala et al. (2002) also observed bacteria associated with empty thecae of *Alexandrium* sp.

As pellicle cysts generally appear in culture upon short-term or sudden adverse conditions (Bravo et al., 2010), shear stress caused by pipette handling was tested as a potential factor inducing encystment prior running to our stress experiments. In our experimental conditions, however, pipette handling did not cause the formation of pellicle cysts if cultures were handled carefully (data not shown). Age of culture may also influence the propensity of cells to transform into pellicle cysts. Pellicle cysts are “naturally” produced in *A. minutum* cultures under normal conditions ranging from 2–3% to 24–25% of total cells, respectively, during the exponential and stationary phases (Bolli et al., 2007). In our experimental conditions, the culture grew steadily until day 14; however, pellicle cysts appeared after 7 days of culture. Occurrence of these pellicle cysts likely resulted from culture ageing and nutrient stress, as previously demonstrated in other *Alexandrium* species (Anderson and Wall, 1978; Jensen and Moestrup, 1997).

##### 4.2. Impact of thermal and mechanical treatments on *A. minutum* cellular responses

Storage on ice resulted in mainly the transformation of vegetative cells into dead cells, pellicle cysts, and “degraded” cells and a few empty thecae (immediately following treatment); whereas, centrifugation resulted mostly in pellicle cysts and a few degraded cells. Vegetative cells re-appeared rapidly (1 day after stress) and multiplied while pellicle cysts decreased. This confirms that *A. minutum* asexual encystment is a protective

process, that is rapidly reversible (Doucette et al., 1989; Figueroa and Bravo, 2005).

Presence of degraded cells was clearly related to both experimental treatments as counts remained low in the control culture. Degraded cells were revealed by both reduced chlorophyll fluorescence and SYBR-Green I fluorescence, as compared to vegetative cells. Reduction in red fluorescence likely resulted from degradation and/or modification of chlorophyll pigments. Chloroplasts or pigments seemed to migrate and fuse towards the center of the cells, resulting in a star-like shape of red fluorescence. Reduction in SYBR-Green I fluorescence intensity may reveal some DNA degradation or nuclear re-arrangement or both. Within the cell, green fluorescence of SYBR-Green I appeared to be diffuse and did not show the characteristic U-shaped nucleus, common to the genus *Alexandrium* and described in detail for *A. minutum* by Figueroa et al. (2007).

Appearance of degraded cells is probably an irreversible process in contrast to that of pellicle cyst formation. The morphological and fluorescent characteristics of degraded cells were very different from those of dead cells, suggesting that these two forms resulted from independent cellular mechanisms. We speculated that degraded cells possibly resulted from failed asexual encystments, while dead cells were obtained from fast killing (thermal shock) prior to encystment. Thermal and mechanical stresses may directly impair vegetative cell division or interfere with pellicle or even sexual cyst formation. The fact that all these stages could exist simultaneously in asynchronous cultures (Olli, 2004) would explain the variety of observed cellular responses to stress. Thecae of degraded cells were clearly damaged, supporting the hypothesis of a failed/aborted encystment.

The main difference between mechanical and thermal stresses was the presence of dead cells in ice-cooled culture (absent in centrifuged culture); 30% of *A. minutum* cells were found dead after the stress, but counts decreased during the following days of culture.

After these stresses, growth of *A. minutum* during the first 7 days was similar to that observed in control culture. During the last week of monitoring, however, cell counts of stressed cultures reached a plateau earlier compared to control cultures. Stressed cultures also contained a higher percentage of cysts than control culture. This suggests that a stress encountered early in the culture may have physiological and growth consequences several days after this stress.

##### 4.3. Impact of chemical stresses on *A. minutum* cellular responses

We further explored cellular responses of *A. minutum* cultures by exposing them to chemical stresses in order to determine if formation of pellicle cysts appears in a dose-dependent manner. Thus, different *A. minutum* cultures were exposed to gradients of saponine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Indeed, formation of pellicle cysts could be used as a defense mechanism to resist or tolerate allochemicals produced by other microalgal species including dinoflagellates (Fistarol et al., 2004) or even digestive enzymes when ingested by bivalves. For both chemicals (saponine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), encystment was dose-dependent. Pellicle cysts were the predominant cell type above 0.05 g L<sup>-1</sup> saponine and above 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Responses to chemical stress observed here are similar to those observed in the dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* when exposed to allelochemicals produced by competing microalgae (Fistarol et al., 2004). Some researchers also observed that strong allelopathic effects resulted in cell death with no pellicle cyst formation. Fistarol et al. (2004) hypothesized that strong allelopathic effects caused permanent damage to cell membranes prior to encystment. Similarly, in our study, occurrence of dead cells appeared to follow an all-or-none pattern as dead cell percentage increased from 3% at



0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to 81% at 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> without pellicle cyst formation. Present method can be used, for example, to assess the impact of pollution or in the evaluation of treatment efficiency of ballast waters. Indeed, surfactants are produced for multiple applications all over the world and are responsible of marked environmental pollution, especially in aquatic environment (Cserhádi et al., 2002). Some studies evaluated efficiency of oxidants, such as hydrogen peroxide, in eradication of phytoplankton from ballast waters to avoid dissemination of invasive/non-endemic species (Gavand et al., 2007).

In both experiments, counts of empty thecae were very well correlated to counts of pellicle cysts (excluding highest doses of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at which pellicle cysts were not detected). Surprisingly, when exposed to the highest doses of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, empty thecae were detected suggesting that encystment was initiated. The loss of thecae seemed to be an extremely rapid process as it occurred before cells were killed. When stress is too brutal and sudden, formation of complete pellicle cysts (pellicle formation) may not be fast or efficient enough to avoid cell death, or the pellicles produced were not strong enough to withstand high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration.

#### 4.4. Encystment and excystment dynamics

As demonstrated with other *Alexandrium* species (Doucette et al., 1989; Figueroa and Bravo, 2005), encystment and excystment are very fast phenomena in *A. minutum*. The present study demonstrated that encystment could be triggered very rapidly by mechanical stresses (i.e. centrifugation) and caused the encystment of nearly the totality of all vegetative cells. Similarly, excystment of *A. minutum* also occurs quite rapidly. The first cysts of *A. minutum* started to excyst after 6 to 9 h after mechanical stress, to reach about 75% of excystment after only 24 h in good culture conditions (16 °C, light, no handling). These results therefore suggest that encystment of *A. minutum* represent a very good and efficient strategy for this algal species to overcome any short term adverse environmental condition.

#### 4.5. Towards a better understanding of the role of encystment

Overall, these experiments confirmed that formation of pellicle cyst is a cellular process allowing protection of *A. minutum* against mechanical, thermal, or chemical stresses. Pellicle encystment is a reversible process as excystment (production of vegetative cells from pellicle cysts) can occur rapidly within a few hours after a stress and be followed by culture growth. Our data indicate, however, that recovery from stress was not absolute, as cell counts of stressed cultures were lower than control cultures after 7 and 14 days of culture. The ability of *A. minutum* to quickly produce a resistant form (cyst) can have implications for the study of interactions between harmful dinoflagellates and other cells or aquatic organisms. Formation of pellicle cysts in experimental tanks could, for example, modulate toxin uptake upon bivalve feeding on these pellicle cysts. The fact that pellicle cysts are immotile could also lead to faster sedimentation of these cells compared to vegetative cells, making them more or less accessible for bivalve feeding. Temporary cysts were observed following cell transit in the digestive tract of *Crassostrea gigas* (Laabir and Gentien, 1999; Laabir et al., 2007; Haberkorn et al., 2010). Recent studies showed the presence of temporary cysts of *A. fundyense* and *A. minutum* in digestive systems of bivalves (*Mytilus edulis* and *C. gigas*) (Galimany et al., 2008; Haberkorn et al., 2010). Laabir and Gentien (1999) reported that 50–90% of the fecal pellets produced by the Pacific Oyster *C. gigas* fed *A. minutum* and *A. tamarensis* were composed of intact, immobile *Alexandrium* sp. cells. Similarly, Persson et al. (2006) demonstrated that 28% of *A. fundyense* survived gut passage by forming pellicle cysts in oysters (*C.*

*virginica*) fed toxic vegetative cells. Moreover, *A. fundyense* was able to resume vegetative growth after gut passage (Hégaret et al., 2008). Formation of pellicle cysts could also therefore appear as a way to rapidly protect cells against digestion upon ingestion by bivalves thus favoring development of *Alexandrium* sp. blooms despite benthic grazing.

The present study provides a new approach to quantify life-cycle changes and viability in *A. minutum* cells. This new and rapid method can be used to improve our understanding of encystment/excystment, cell viability, and subsequent growth of *Alexandrium* populations, under real or simulated environmental conditions.

#### Acknowledgments

Sincere thanks are due to Gary H. Wikfors for English corrections. This study was carried out with the financial support of the National Research Agency (ANR), "MODECOPHY" Project 06SEST23 (2006–2009) and of the Brittany Region, "EPHYTOX" Project (2006–2009).[SS]

#### References

- Anderson, D.M., Wall, B., 1978. Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *Gonyaulax excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. *J. Phycol.* 14, 224–234.
- Anderson, D.M., 1998. Physiology and bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species, with emphasis on life cycle transitions. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 29–47.
- Biegala, I.C., Kennaway, G., Alverca, E., Lennon, J.F., Vaulot, D., Simon, N., 2002. Identification of bacteria associated with dinoflagellates (Dinophyceae) *Alexandrium* spp. using tyramide signal amplification-fluorescent in situ hybridization and confocal microscopy. *J. Phycol.* 38, 404–411.
- Binet, M.T., Stauber, J.L., 2006. Rapid flow cytometric method for the assessment of toxic dinoflagellate cyst viability. *Mar. Environ. Res.* 62, 247–260.
- Bolli, L., Llaveria, G., Garcés, E., Guadalupe, O., van Lenning, K., Peters, F., Berdalet, E., 2007. Modulation of ecdysal cyst and toxin dynamics of two *Alexandrium* (Dinophyceae) species under small-scale turbulence. *Biogeosciences* 4, 559–567.
- Bravo, I., Figueroa, R.I., Garcés, E., Massanet, S.F.A., 2010. The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: the example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep Sea Res.* 57 (3–4), 166–174.
- Brussaard, C.P.D., Marie, D., Thyrrhaug, R., Bratbak, G., 2001. Flow cytometric analysis of phytoplankton viability following viral infection. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 157–166.
- Cserhádi, T., Forgács, E., Oros, G., 2002. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ. Int.* 28, 337–348.
- Doucette, G.J., Cembella, A.D., Boyer, G.L., 1989. Cyst formation in the red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* (Dinophyceae): effects of iron stress. *J. Phycol.* 25, 721–731.
- Dubelaar, G.B.J., Jonker, R.R., 2000. Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Sci. Mar.* 64, 135–156.
- Figueroa, R.I., Bravo, I., 2005. Sexual reproduction and two different encystment strategies of *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) in culture. *J. Phycol.* 41, 370–379.
- Figueroa, R.I., Bravo, I., Garcés, E., 2005. Effects of nutritional factors and different parental crosses on the encystment and excystment of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture. *Phycologia* 44, 658–670.
- Figueroa, R.I., Garcés, E., Bravo, I., 2007. Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (Gonyaulacales, dinophyceae) in culture. *J. Phycol.* 43, 1039–1053.
- Figueroa, R.I., Bravo, I., Garcés, E., 2008. The significance of sexual versus asexual cyst formation in the life cycle of the noxious dinoflagellate *Alexandrium peruvianum*. *Harmful Algae* 7, 653–663.
- Fistarol, G.O., Legrand, C., Rengefors, K., Granéli, E., 2004. Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environ. Microbiol.* 6, 791–798.
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A., 2000. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci. Total Environ.* 247, 119–126.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae* 7, 702–711.
- Garcés, E., Delgado, M., Masó, M., Camp, J., 1998. Life history and in situ growth rates of *Alexandrium taylori* (Dinophyceae, Pyrrophyta). *J. Phycol.* 34, 880–887.
- Garcés, E., Masó, M., Camp, J., 1999. A recurrent and localized dinoflagellate bloom in a Mediterranean beach. *J. Plankton Res.* 21, 2373–2391.
- Gavand, M.R., McClintock, J.B., Amsler, C.D., Peters, R.W., Angus, R.A., 2007. Effects of sonication and advanced chemical oxidants on the unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta* and cysts, larvae and adults of the brine shrimp *Artemia*

- salina*: a prospective treatment to eradicate invasive organisms from ballast water. Mar. Pollut. Bull. 54, 1777–1788.
- Grzebyk, D., Berland, B., 1996. Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. J. Plankton Res. 18, 1837–1849.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. Phycologia 32, 234–236.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goic, N., Moal, J., Suquet, M., Gueguen, M., Sunila, I., Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. Harmful Algae 9 (5), 427–439.
- Hégaret, H., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Pate, S., Burkholder, J.A.M., 2008. Potential transport of harmful algae through relocation of bivalve molluscs. Mar. Ecol. Prog. Ser. 361, 169–179.
- Hoagland, P., Anderson, D.M., Kaoru, Y., White, A.W., 2002. The economic effects of harmful algal blooms in states: estimates, assessment issues, and information. Estuaries 25, 819–837.
- Howlett, N.G., Avery, S.V., 1999. Flow cytometric investigation of heterogeneous copper-sensitivity in asynchronously grown *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. 176, 379–386.
- Jensen, M.O., Moestrup, O., 1997. Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostensefeldii*: life history and growth at different temperatures and salinities. Eur. J. Phycol. 32, 9–18.
- Kremp, A., Parrow, M.W., 2006. Evidence for asexual resting cysts in the life cycle of the marine peridinioid dinoflagellate, *Scrippsiella hangoei*. J. Phycol. 42, 400–409.
- Laabir, M., Gentien, P., 1999. Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. J. Shellfish Res. 18, 217–222.
- Laabir, M., Amzil, Z., Lassus, P., Masseret, E., Tapilatu, Y., De Vargas, R., Grzebyk, D., 2007. Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. Aquat. Living Resour. 20, 51–57.
- Lage, O.M., Sansonetti, F., O'Connor, J.E., Parente, A.M., 2001. Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Cytometry 44, 226–235.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaulot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine Picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. Appl. Environ. Microbiol. 63, 186–193.
- Marie, D., Partensky, F., Vaulot, D., Brussaard, C., 1999. Current Protocols in Marine Samples. John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 11.11.11–11.11.15.
- Marie, D., Simon, N., Vaulot, D., 2005. Phytoplankton cell counting by flow cytometry. In: Andersen, R.A. (Ed.), Algal Culturing Techniques. Academic Press/Elsevier, San Diego, CA, pp. 253–267.
- Moestrup, Ø., Codd, G.A., Elbrächter, M., Faust, M.A., Fraga, S., Fukuyo, Y., Cronberg, G., Halim, Y., Taylor, F.J.R., Zingone, A., 2002. IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, <http://ioc.unesco.org/hab/data4taxdist.htm>.
- Montresor, M., 1995. The life history of *Alexandrium pseudogonyaulax* (Gonyaulacales, Dinophyceae). Phycologia 34, 444–448.
- Nagasaki, K., Yamaguchi, M., Imai, I., 2000. Algicidal activity of a killer bacterium against the harmful red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* isolated from Ago Bay, Japan. Nippon-Suisan-Gakkaish 66, 666–673.
- Olli, K., 2004. Temporary cyst formation of *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae) in natural populations. Mar. Biol. 145, 1–8.
- Persson, A., Smith, B.C., Wikfors, G.H., Quilliam, M., 2006. Grazing on toxic *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Harmful Algae 5, 678–684.
- Pfiester, L.A., Anderson, D.M., 1987. Dinoflagellate reproduction. In: Taylor, F.J.R. (Ed.), The Biology of Dinoflagellates. Blackwell Science, Oxford, pp. 611–648.
- Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? Cytometry Part A 64A, 16–26.
- Sekida, S., Horiguchi, T., Okuda, K., 2001. Development of the cell covering in the dinoflagellate *Scrippsiella hexapraecingula* (Peridinales, Dinophyceae). Phycol. Res. 49, 163–176.
- Stachowski-Haberkorn, S., Beker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., de la Broise, D., 2008. Impact of roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ experiment. Aquat. Toxicol. 89, 232–241.
- Stachowski-Haberkorn, S., Beker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Quiniou, L., de la Broise, D., 2009. Comparative study of three analysis methods (TIGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities. Ecotoxicology 18, 364–376.
- Stauber, J., Franklin, N.M., Adams, M., 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. Trends Biotechnol. 20, 141–143.
- Taylor, F.J.R., 1987. The Biology of Dinoflagellates. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 785 pp.
- Veldhuis, M.J.W., Cucci, T.L., Sieracki, M.E., 1997. Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: taxonomic and ecological implications. J. Phycol. 33, 527–541.
- Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., 2000. Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. Sci. Mar. 64, 121–134.
- Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., Timmermans, K.R., 2001. Cell death in phytoplankton: correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth. Eur. J. Phycol. 36, 167–177.



## 1.3. Synthèse

Afin d'évaluer l'influence des manipulations sur la physiologie d'*A. minutum*, des cultures ont été exposées à différentes sources de stress : thermique, chimique et mécanique. L'exposition des cellules à un stress mécanique a provoqué une augmentation de la mortalité et de la formation de kystes temporaires. Les effets observés ont montré une fragilité de cette espèce aux conditions rencontrées lors de l'utilisation d'une pompe dans les systèmes expérimentaux permettant d'exposer les huîtres. Par contre, l'utilisation d'un bullage s'est avérée moins stressante pour le dinoflagellé. Nous avons donc choisi d'adopter un tel système pour les expérimentations d'interactions avec *C. gigas*. De même, certaines précautions ont été prises lors de la manipulation des cultures, comme éviter d'avoir recours à l'utilisation d'un vortex ou de la centrifugation.

Après avoir mis en place un système expérimental permettant de minimiser la perturbation des cellules de micro-algues, nous avons procédé à l'exposition des huîtres à *A. minutum*. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés au comportement des huîtres en présence du dinoflagellé toxique. Puis, nous avons tenté de mettre en évidence un lien entre le comportement des huîtres, la concentration des micro-algues dans l'eau et l'accumulation de toxine.



## **2. Impacts d'*A. minutum* sur l'activité valvaire de *C. gigas***

### **2.1. Introduction**

La présence de micro-algues toxiques dans l'environnement des bivalves est susceptible d'induire une réponse de la part de ceux-ci, à commencer par des changements de comportement. Dans un premier temps, il était intéressant de tester si la présence d'*A. minutum* dans l'environnement des huîtres, *C. gigas*, pouvait induire une modification de leur comportement. Par la suite, il était essentiel d'évaluer la possibilité d'établir un lien entre le changement de comportement observé, la concentration en micro-algues dans l'eau et la quantité de toxine accumulée par les huîtres au niveau individuel. Pour ce faire, un appareillage permettant d'enregistrer, de façon individuelle et simultanée, l'activité valvaire de bivalves (valvomètre) a été utilisé lors de l'exposition d'huîtres à *A. minutum*.





## 2.2. Article 2 – Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*

Aquaculture 298 (2010) 338–345



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aqua-online](http://www.elsevier.com/locate/aqua-online)



### Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*

Damien Tran<sup>a,\*</sup>, Hansy Haberkorn<sup>b</sup>, Philippe Soudant<sup>b</sup>, Pierre Ciret<sup>a</sup>, Jean-Charles Massabau<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université Bordeaux 1, CNRS, UMR 5805 EPOC, Place du Dr Peyneau, 33120, Arcachon, France

<sup>b</sup> Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, IUEM-UBO, Place Nicolas Copernic, 29280, Plouzané, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 9 June 2009

Received in revised form 21 September 2009

Accepted 30 October 2009

##### Keywords:

*Crassostrea gigas*

*Alexandrium minutum*

Valve activity response

Harmful algae

#### ABSTRACT

We describe the valve-activity behavior of oysters, *Crassostrea gigas*, exposed experimentally to the harmful alga *Alexandrium minutum* ( $\approx 3500$  cell ml<sup>-1</sup>) for 7-day periods under laboratory conditions. Our aim was to assess behavioral responses of oyster species during a mimicked bloom exposure. We determined different characteristic parameters of valve activity, such as daily valve opening duration, daily number of micro-closures, and valve-opening amplitude using a High Frequency-Non Invasive valvometer. In comparison with oysters exposed to non-toxic algae, *T-Ischrysis* or *Heterocapsa triquetra*, the valve activity of *C. gigas* is measurably different when exposed to toxic algae *A. minutum*. Surprisingly, daily valve-opening duration increased, as well as micro-closure activity, while valve-opening amplitude decreased. The response to *A. minutum* is fast, within 1 h after algae exposure. Following *A. minutum* exposure, recovery to control patterns was observed within 4–5 days. The behavioral alterations upon exposure to *A. minutum* can be thus used as a complementary physiological variable to other well-established physiological and biochemical measurements.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Toxic algae blooms are a major problem in the world, in terms of aquatic ecosystem risks, human health, and economy (Bricelj and Shumway, 1998). Specifically, toxin accumulation in marine bivalves is a common phenomenon during algal blooming events that can lead to a closure of shellfish harvest for human consumption (Cembella and Todd, 1993).

Previous studies showed that filter-feeding bivalves exhibit different behavioral responses when exposed to a toxic algal bloom (Bricelj and Shumway, 1998). Responses may be related to the relative toxicity of compounds produced by the algae (Bricelj et al., 1996), toxins accumulated in the tissues of bivalves (Bricelj et al., 1991), and the history of harmful algal bloom exposure in any given ecosystem (Shumway and Cucci, 1987). Toxic algae of the genus *Alexandrium* are an important source of marine toxins in contaminated bivalves (Balech, 1990). *Alexandrium minutum* is found in coastal and estuarine waters. It is established in the coastal waters of Europe (Northeast Atlantic, North Sea, Baltic, Sea, Mediterranean and Black Sea), Southeast Asian Waters (South China Sea) and in parts of Southern Australia and New Zealand (Chang et al., 1995; Hallegraeff, 1993). This species also has been reported in North America (Page et al., 2001). The species *A. minutum* can reach up to  $1.8 \cdot 10^8$  cells/L in natural marine European

coastal waters (Belin and Raffin, 1998). Oysters, such as *C. gigas*, are known to reduce filtration rate when exposed to toxic dinoflagellate algae *Alexandrium* sp. (Bardouil et al., 1993; Lassus et al., 1999). Interestingly, *C. gigas* has been classified as having average sensitivity, in terms of response to paralytic shellfish poisoning toxins (PSP toxins) produced by toxic dinoflagellates. Indeed, oysters accumulate less PSP toxins than the mussel *Mytilus edulis*, described as a non-sensitive species (Bricelj and Shumway, 1998) that does not modify its nutrition activity. Oysters, such as *C. gigas* or *C. virginica* accumulate more toxin than the clam *Mya arenaria*, a highly sensitive species, which shows modified burrowing activity and reduces or even stops filtration activity under similar exposure. The scallop *Argopecten maximus* appears to be very sensitive to PSP toxins as well, increasing valve-clapping frequency and closing the shell under similar exposure conditions (Bricelj and Shumway, 1998).

In the present study, we describe the valve activity of Pacific oysters *C. gigas* during a 7-day exposure period to an ecologically relevant concentration of *A. minutum*. Valve activity was measured with a laboratory-made valvometer (Chambon et al., 2007; Tran et al., 2003; [http://www.domino.u-bordeaux.fr/molluscan\\_eye](http://www.domino.u-bordeaux.fr/molluscan_eye)). The original feature of this valvometer is that it uses lightweight electrodes with high sensitivity and with minimal experimental constraints. We report here different measures of valve-activity response, such as changes in daily valve-opening duration, number of micro-closures, or partial closures, and valve-opening amplitude. Our aim was to characterize, under simplified but well-controlled laboratory conditions, a putative behavioral alteration which might sign the impact of *A. minutum* on the oyster.

\* Corresponding author. Université Bordeaux 1, CNRS, UMR 5805 EPOC, Place du Dr Peyneau, 33120, Arcachon, France. Tel.: +33556223920; fax: +33556549383.  
E-mail address: [d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr) (D. Tran).



The response to this toxic alga was compared to behavior of oysters in the presence of the non-toxic algae *Isochrysis galbana* clone Tahitian (T-Iso) or *Heterocapsa triquetra*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Oyster characteristics and general conditions

The study was carried out in Brest (Brittany, France), in October–November 2007 (experiment 1) and December–January 2008 (experiment 2) with pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Oysters were obtained from a shellfish farm in Kerner Island (Morbihan, France). Two homogenous groups of diploid oysters ( $n = 16$ /experiment) were chosen *a priori* according to the shell length ( $75 \pm 8$  mm shell length;  $34.5 \pm 7.6$  g total fresh weight, shell plus flesh). During experiment 1, oysters were distributed randomly into two 15-liter tanks (1 test and 1 control) i.e. 8 oysters in each. In experiment 2, oysters were placed into eight 4-liter tanks (4 tests and 4 controls) with 2 oysters in each. In both experiments, oysters were acclimated with 14 ml min<sup>-1</sup> continuous flow of sea water (value at  $t_0 = 14.5$  ml min<sup>-1</sup>, value at  $t_{10} = 13.5$  ml min<sup>-1</sup>; filtered to 0.5  $\mu$ m) with T-Iso at  $10^5$  cells ml<sup>-1</sup> for 10 days at the temperature of  $16 \pm 1$  °C. Oysters were maintained in the same tanks during acclimation, exposure, and recovery phases, to avoid behavioral disturbance due to handling.

### 2.2. Algal culture

*A. minutum* (Halim, 1960; strain AM89BM) was cultured in autoclaved, 1  $\mu$ m-filtered seawater. The dinoflagellate was grown in 10-l batch cultures in L1 medium. Cultures were maintained for 12 days (duration of the exponential growth phase in our conditions) at  $16 \pm 1$  °C and 100  $\mu$ mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, with a dark:light cycle of 12:12 h. This strain produced 1.3 pg saxitoxin equivalent (STX eq.) per cell at the end of the exponential growth phase.

T-Iso and *Heterocapsa triquetra* were grown in 1-l batch cultures in autoclaved, 1  $\mu$ m-filtered seawater enriched with L1 nutrients. Cultures were maintained 5 days at  $16 \pm 1$  °C and 100  $\mu$ mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, with a dark:light cycle of 12:12 h.

### 2.3. Experimental procedure for *A. minutum* oyster exposures

The two experiments were performed in an isolated room with no human activity to limit stressful stimulation of the oysters. During the experiment, the experimental tanks were isolated from vibrations by using vibration-free tables to minimize external disturbance that could interfere with the spontaneous behavior of the oysters. The experiment was carried out with a photoperiod of 12 h light (8 am to 8 pm) and 12 h dark (8 pm to 8 am).

Microalgal cell suspensions were processed by dilution of cultures in 1  $\mu$ m filtered sea water to reach appropriated concentration. Multi-canal peristaltic-pump was used to distribute microalgae cells suspension individually in each tank (one canal per tank). A two hundred liters tank was used to supply T-Iso suspension in all tanks during acclimation period (both experiments). During exposure period, two supply tanks of hundred liters were used to distribute independently control (T-Iso or *H. triquetra*) or toxic (*A. minutum*) diets. Refill of microalgal cell suspension (every day at 2 pm) in supply tanks were proceed without disturbance of experimental tanks containing oysters. In order to simulate a bloom arrival, flow of peristaltic-pump was increased to 150 ml min<sup>-1</sup> (in both conditions) during 15 min at the beginning of exposure.

Experiment 1, October–November 2007. During the 10-day acclimation period (called reference), two groups of oysters ( $n = 8$  per tank) were fed with the alga T-Iso. Following the acclimation period, one group of oysters was exposed for 7 days, i.e. the exposure period, to a toxin-producing strain of *A. minutum* (test group), while the other

group (control group) continued with T-Iso. The control group was supplied with a 14 ml min<sup>-1</sup> continuous flow of  $10^5$  cells ml<sup>-1</sup> T-Iso, whereas, the group exposed to *A. minutum* was supplied with 14 ml min<sup>-1</sup> continuous flow of  $5.10^3$  cells ml<sup>-1</sup>. The exposure to *A. minutum* started at 2 pm after the 10-day acclimation period.

Experiment 2, December–January 2008. To test (i) the possibility that the oysters exposed to *A. minutum* may respond to differences in particle concentrations and size alone and (ii) the replicability of the above observations in a different set of animals at a different period, we then used a non-toxic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* as the control during the *A. minutum* exposure. *H. triquetra* cells have size (19–28  $\mu$ m) similar to *A. minutum* cells (23–29  $\mu$ m). Again, during the 10-day acclimation period (reference), eight groups of 2 oysters were fed first with the alga T-Iso (size 3–6  $\mu$ m) at  $10^5$  cells ml<sup>-1</sup>. Following the acclimation period, one group of oysters (4 replicates of 2 oysters) was exposed for 7 days, i.e. the exposure period, to *A. minutum* (test group) at  $5.10^3$  cells ml<sup>-1</sup>, while the other group (control group, 4 replicates of 2 oysters) was exposed to *H. triquetra* at  $5.10^3$  cells ml<sup>-1</sup>. Recovery after *A. minutum* exposure was followed during a 13-day period while all animals were fed with *H. triquetra*. All replicates were food supplied with a 14 ml min<sup>-1</sup> continuous flow.

### 2.4. Measurements of phytoplankton cell variables by flow cytometry

Characterization of algae cells were performed using a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA USA) flow cytometer (FCM) equipped with a 488 nm argon laser.

Parameters were measured individually on fixed culture samples (3% formaldehyde – final concentration). Threshold was set as FL3 (red fluorescence, 550–600 nm) to detect only chlorophyll containing particles, defined as phytoplanktonic cells. Settings were adjusted in order to visualize all phytoplanktonic cells on the same cytogram with the Forward Scatter (FSC, relating to cell light diffraction at small angle) and the Side Scatter (SSC, relating to cell light diffraction at large angle) as parameters. *A. minutum* and *H. triquetra* cells are characterized by high FSC and high SSC, while *I. galbana* cells have low FSC and SSC.

During the exposition period, 1 ml water samples were collected daily, at 2 pm, in oyster tanks and in the supply tank to determine cell concentrations. Samples were fixed in 3% formaldehyde (final concentration) and analyzed by flow cytometry. Concentrations were estimated from the flow-rate measurement of the flow-cytometer (Marie et al., 1999) as all samples were run for 1 min. Results were expressed as number of cells per ml.

### 2.5. *C. gigas* valve-activity measurement

To evaluate throughout the experiment the effect of *A. minutum* on the valve behavior of *C. gigas*, we recorded the valve activity continuously with HFNI (High Frequency – Non Invasive) valvometer. The oysters were equipped (at  $t_{10}$  days) with lightweight ( $\approx 1$  g) electro-magnetic electrodes glued onto both shells. Briefly, the electrodes were welded to a covered, multistrand copper wire (diameter: 0.98 mm, length: 60–80 cm). The electrode-copper wire weld and the external face of the electrodes were coated with resin; this allows the oysters to move valves without constraint. The measurement principle was based on the application of Maxwell's Law,  $\varepsilon = -N \cdot (d\phi_B / dt)$ , where  $\varepsilon$  is the electromotive force (in Volt),  $N$  is the number of turns of wire,  $\phi_B$  is the magnetic flux (in Webbers), and  $t$  the time. This apparatus measures an induced voltage that varies according to the distance between the electromagnetic electrodes. For more details, some other basic principles are described in Tran et al. (2003) and Chambon et al. (2007), as well as data about the required adaptation periods before experimental set-up (Tran et al., 2003). The record of valve activity started 4 days (experiment 1) and 7 days (experiment 2) before exposure to compare oyster behavior in the 2 (experiment 1)

and 8 (experiment 2) tanks under reference conditions (T-Iso feeding). Following initiation of experiments, valve activity was measured continuously for 7 days during the exposure to *A. minutum* and T-Iso (experiment 1) or *H. triquetra* (experiment 2). In experiment 2, valve activity was recorded 13 more days after the 7th day of exposure to monitor behavioral recovery (oysters fed *H. triquetra*).

The free ends of the electrodes were connected to an electronic apparatus composed mainly of a multiplexer that switched the current every 100 ms from one pair of electrodes to another, and a computer driving the apparatus via a data acquisition card (LAB PC 1200; National Instruments, Austin, TX, USA), using LabView 8.0 software (National Instruments). In Brest, where the experiments were run, the computer was connected to the Internet, and the recordings were acquired online on a second PC located at the Marine Biological Station in Arcachon, South-Western France.

## 2.6. Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  1 SE. Treatment differences were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) after checking assumptions (normality and homoscedasticity of the error term). When assumptions were not met, the non-parametric Kruskal–Wallis test was used. If the null hypothesis was rejected, the Tukey test was applied to determine significant differences between conditions. For all statistical results, a probability of  $p < 0.05$  was considered significant. Statistical analyses were performed using Sigma Stat software (Version 3.5, SYSTAT, Chicago, USA).

## 3. Results

### 3.1. *A. minutum* exposure

During the exposure to *A. minutum*, the flow renewal of alga supply in the experimental tank of both experiments was  $14 \text{ ml min}^{-1}$  from the supply tank at constant concentration of *A. minutum*, which was in average  $4981 \pm 253 \text{ cell ml}^{-1}$  (experiment 1 – 8 days, 2 samples in supply tank) and  $4545 \pm 323 \text{ cell ml}^{-1}$  (experiment 2 – 7 days, 2 samples in supply tank), i.e. equivalent to  $6.7 \text{ ng ml}^{-1}$  STX eq (experiment 1) and  $5.9 \text{ ng ml}^{-1}$  STX eq (experiment 2). In the experimental tank, the con-

centration of *A. minutum* was in average  $3617 \pm 439 \text{ cell ml}^{-1}$  (experiment 1 – 8 days, 2 samples) and  $3421 \pm 723 \text{ cell ml}^{-1}$  (experiment 2 – 7 days, 1 sample per tank), i.e. respectively  $4.7$  and  $4.4 \text{ ng ml}^{-1}$  STX eq. As the renewal rate in the tank was constant, this result shows that oysters did filtrate during the exposure period. Visual inspection of the tank wall did not reveal any increase of sedimentation. Fig. 1 shows pictures of each species used in our experiments (A1: T-Iso; A2: *H. triquetra*; A3: *A. minutum*). The cellular SSC and FSC parameters of each alga species (Fig. 1 B1–B3) confirm that *H. triquetra* and *A. minutum* are morphologically similar but quite different from T-Iso.

### 3.2. Valve activity behavior

#### 3.2.1. Experiment 1

The records shown in Fig. 2 belong to 3 individuals but these compartments were typical of the three dietary conditionings. Characteristics of valve behavior of oyster fed *A. minutum* (Fig. 2C) were completely different from those of oysters fed with T-Iso (Fig. 2A) or *H. triquetra* (Fig. 2B). All studied parameters were deeply modified, in terms of daily valve-opening duration (= sum of total time spent open during the day), daily micro-closure activity (= sum of micro-closures during the day) and valve-opening amplitude upon *A. minutum* exposure. Fig. 3A shows the change of mean daily valve-opening duration during the 4 last days of acclimation period to T-Iso and then for the 7 following days of the experiment. Note first that during the acclimation period, the daily valve-opening duration was not significantly different between both tanks ( $p = 0.17$ ). The daily valve-opening duration of control oysters fed T-Iso ( $t_0$ – $t_7$ ,  $42.7 \pm 2.1\%$ ) during the exposure period remained steady as compared to the acclimation period ( $t_{-4}$ – $t_0$ ,  $48.5 \pm 3.7\%$ ). This shows the stability of *C. gigas* behavior under our experimental conditions when fed a non-toxic alga. On the contrary, the oysters exposed to *A. minutum* (closed circle) during the 7 days of exposure were opened daily for a significantly longer time ( $p < 0.001$ ;  $69.8 \pm 2.4\%$ , instead of  $42.7 \pm 2.1\%$ ) than in the control condition, i.e. fed with T-Iso (open circle). The difference reached +30.5% of daily valve-opening duration in the presence of *A. minutum*. Fig. 3B shows the number of daily valve micro-closures, or partial closures, during the 4 days of the acclimation period and the following 7-day exposure period. During the acclimation period, the pattern of valve

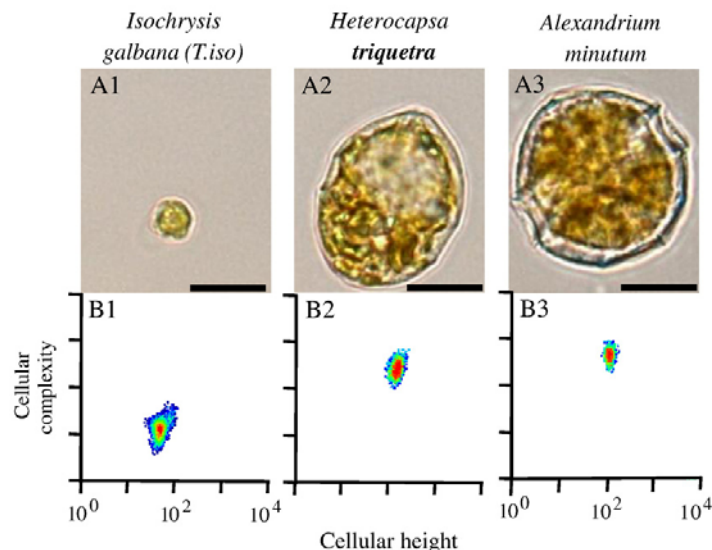


Fig. 1. Pictures (scale bars =  $10 \mu\text{m}$ ) of *Isochrysis galbana* (A1), *Heterocapsa triquetra* (A2) and *Alexandrium minutum* (A3) with corresponding cytogram (B1, B2 and B3, respectively) showing cellular SSC and FSC.



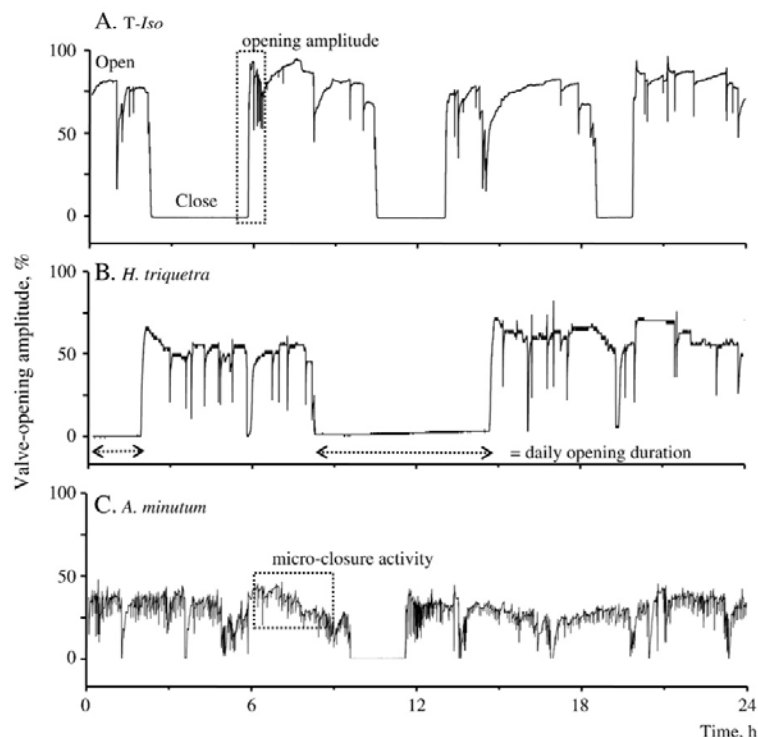


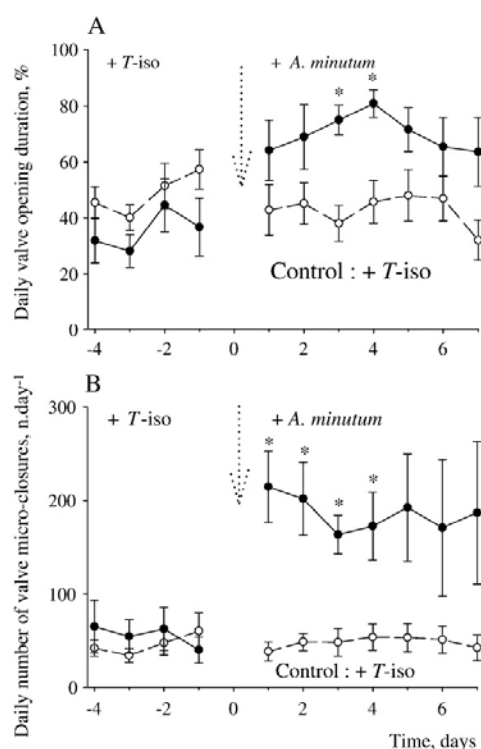
Fig. 2. Typical records of valve activity behavior of *Crassostrea gigas* during a one-day period. A. *C. gigas* fed with T-Iso. B. *C. gigas* fed with a non-toxic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Crassostrea gigas* exposed to toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*. Three parameters were studied to characterize the behavior: daily valve-opening duration; daily valve micro-closure; valve-opening amplitude.

closure was equivalent in both tanks. Again, there were no significant difference in the number of daily valve micro-closures between the acclimation period and the 7-day experimental period in the oysters fed T-Iso ( $p = 0.70$ ;  $46.0 \pm 5.5\%$  and  $47.9 \pm 2.1\%$ , respectively). This is another illustration of the stability and reproducibility of *C. gigas* behavior in our experimental conditions. During the 7-day exposure period, the oysters exposed to *A. minutum* (closed circle) exhibited significantly more valve micro-closures ( $p < 0.001$ ), i.e.  $185.9 \pm 6.9$ , versus  $47.9 \pm 2.1$  in the control condition (open circle). The number of valve micro-closures was 3.9 time higher in the presence of *A. minutum*. Fig. 4A and B show the distribution of valve opening amplitude respectively in control and *A. minutum* exposed oysters during the 7 day exposure period. The valve opening amplitude was plotted (%) according to 10 classes of amplitude of opening ranging from 0, i.e. less than 5% of the maximum recorded amplitude in a given oyster, to 100% i.e. maximal valve-opening amplitude during the 7-day exposure period. In the control condition, three modes of opening amplitude values were most frequently observed: 0–10%, 40–50% and the maximum in the range 80–90% with  $17.1 \pm 2.2\%$  of time spent in this latter range. Interestingly, in oysters exposed to *A. minutum*, the occurrence of fully opened animals mostly vanished. Only two major classes remained: 0–10% and 30–40% with  $28.1 \pm 3.1\%$  of time spending in this latter range. In the presence of *A. minutum*, *C. gigas* behavior was thus characterized by a disappearance of sub-maximal valve opening amplitude, i.e. 80–90% of the maximal opening amplitude, as the occurrence decreased down to  $1.9 \pm 1.3\%$  (significantly different from that in the control conditions,  $p < 0.001$ ). Finally we addressed the issue regarding the delay of the response to *A. minutum*. Fig. 5 presents the micro-closure activity on the 1st day of exposure between 8 am to 8 pm *A. minutum* were added at 2 pm in 15 min to mimic a bloom

arrival. It is clear that the mean micro-closure activity increased within the first hour of exposure. The difference between the uncontaminated and the contaminated groups was highly significant ( $p = 0.004$ ). Note finally that no animals died during the full set of experiments.

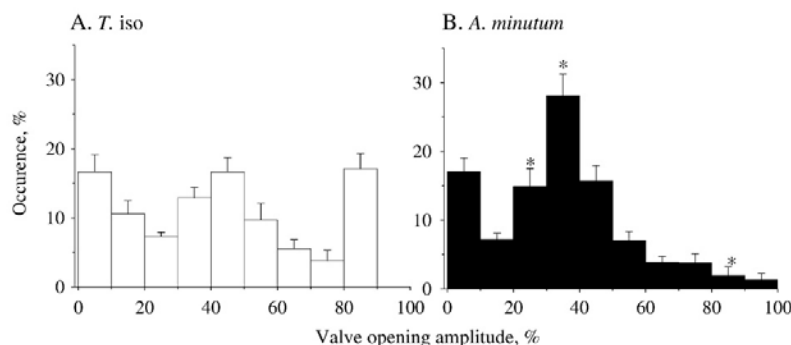
### 3.2.2. Experiment 2

To test (i) the possibility that the above results could be due to a difference in particle concentration or size alone between the reference algae, T-Iso and *A. minutum*, and (ii) the reliability of the valve gape response to *A. minutum* under our experimental conditions, we then repeated the above experiment 2 months later in a second series of experimental groups, which were fed *Heterocapsa triquetra* or *A. minutum* during the 7-day exposure period. In this second experiment, we also recorded valve activity after exposure period, to study how and when oysters could recover their initial valve behavior. During the recovery period, all the animals were fed with *H. triquetra*. Fig. 6A shows the change of mean daily valve-opening duration during acclimation, exposure and recovery periods. For the control condition (4 replicates, open circle) mean daily valve opening duration was the same during the 8 last days of the acclimation period (+ T-Iso) and the 20 days (+ *H. triquetra*) corresponding to exposure and recovery periods ( $p = 0.852$ ). On contrary, mean daily valve opening duration of the *A. minutum* exposed oyster group (closed circle) was significantly ( $p = 0.019$ ) higher during exposure period ( $53.1 \pm 2.6\%$ ) than during the acclimation and recovery periods ( $39.0 \pm 4.1$  and  $36.1 \pm 2.4\%$ , respectively). During the acclimation period, the pattern of valve micro-closure was again not different between both groups of feeding regime (Fig. 6B). On the contrary, the exposure to *A. minutum* was clearly associated to a significant increased of micro-closures number compared to the condition with

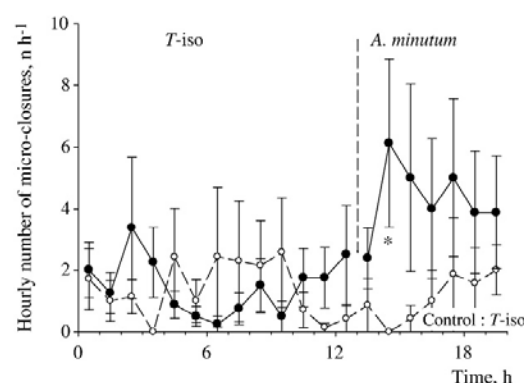


**Fig. 3.** Experiment 1. Measure of daily valve opening duration (A) and daily valve micro-closures (B) of *C. gigas*. Open circles, the oysters were fed with T-Iso (control). Closed circles, the oysters were fed with T-Iso and then exposed to *Alexandrium minutum* for 7 days. Mean  $\pm$  standard error,  $n=8$  per condition. \* Significantly different from the control condition on the same day,  $p$ -value = 0.05.

*H. triquetra* ( $135.4 \pm 8.8$  and  $36.4 \pm 2.7$  micro-closures respectively,  $p < 0.001$ ). Importantly, feeding with *H. triquetra* (similar size and shape as *A. minutum*) did not result in any significant increase of micro-closure number by comparison to the acclimation period with T-Iso feeding ( $p = 0.082$ ). Both results demonstrate the specificity of the response to *A. minutum*. Finally, Fig. 6B shows that recovery towards reference conditions takes 4–5 days to return to control status in presence of *H. triquetra*. It demonstrates that the *Alexandrium* induced behavioral changes was reversible as there was no statistical difference ( $p = 0.534$ ) between acclimation period and the 9 last days of recovery



**Fig. 4.** Experiment 1. Occurrence in percentage of valve opening amplitude (10 ranges from 0 to 100% of amplitude) of *C. gigas* during the 7-day experiment. A. Control, oysters fed with T-Iso. B. Oysters exposed to *Alexandrium minutum*. Mean  $\pm$  standard error,  $n=8$ . \* Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the same range in the control condition.



**Fig. 5.** Experiment 1. Hourly micro-closures of *C. gigas* during the first day of *A. minutum* exposure, 8 am to 8 pm. Open circles, the oysters were fed with T-Iso (control). Closed circles, the oysters were fed with T-Iso until 2 pm and exposed to *Alexandrium minutum* after 2 pm. Mean  $\pm$  standard error,  $n=8$  per condition. \* Significantly different from the control condition on the same day,  $p$ -value = 0.05.

periods (compare in Fig. 6 the pre-acclimation period and 12–20 day period).

The comparison between Fig. 7A and B further illustrates that the most frequently observed valve-opening amplitude was quite different between *H. triquetra* and *A. minutum* despite their close similarities in terms of concentration and algal size (Fig. 1). In control condition (+*H. triquetra*), opening amplitude values between 50 and 80% were most frequently observed and Fig. 7A exhibits a smooth data distribution. The situation was drastically different upon *A. minutum* exposure: the opening amplitude values were shifted leftward and the distribution was narrower with a mode in the range 30–40%.

### 3.2.3. Comparison of both experiments

No significant differences for the three measured behavior parameters were observed between control oysters (+T-Iso) of both experiments during acclimation period (T-Iso feeding), which showed the reliability of our experiments and the replicable patterns of valve activity. During exposure period, behavior of control oysters, fed T-Iso in experiment 1 or fed *H. triquetra* in experiment 2, was similar with no significant difference between experiments for any of measured valve activity parameters. On the contrary, upon *A. minutum* exposure, duration of valve opening increased in a similar manner in both experiments, +30.5% and +26.6% in experiment 1 and 2, respectively. Similarly again, increase of daily valve micro-closures in *A. minutum* exposed oysters was similar between both experiments ( $185.9 \pm 6.9$  and  $135.4 \pm 8.8$  in experiments 1 and 2, respectively). As for the above

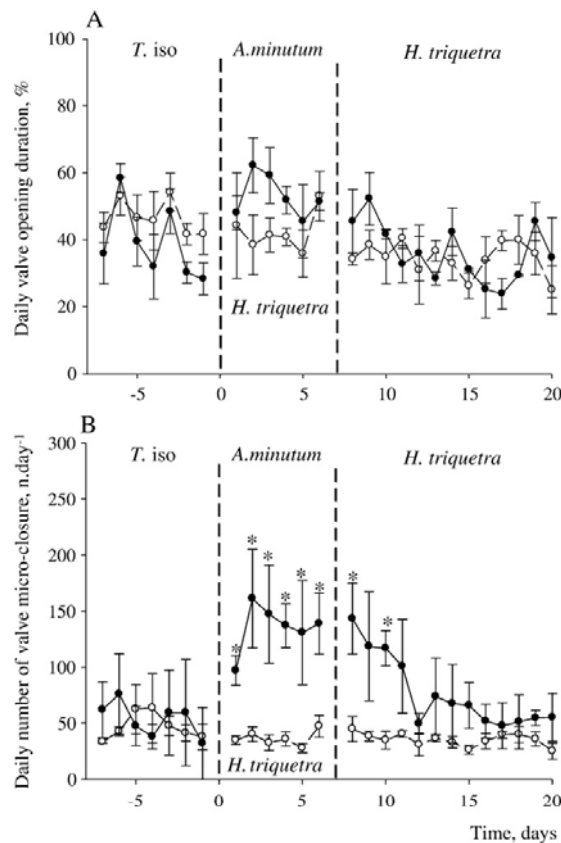


Fig. 6. Experiment 2. Measure of daily valve opening duration (A) and daily valve micro-closures (B) of *C. gigas*. Days -7 to 0, all oysters were fed with *T. iso* (acclimation period). Test period, from day 0 to day 7, the oysters were either fed with *Heterocapsa triquetra* (open circles) or *Alexandrium minutum* (closed circles). Recovery, all oysters were fed *Heterocapsa triquetra*. Mean  $\pm$  standard error,  $n = 8$  per condition. \* Significantly different from the control condition on the same day,  $p$ -value = 0.05.

parameters, most frequent opening amplitude values upon *A. minutum* were similar in both experiments (30–40% of maximal amplitude). All together, these observations show that oysters exposed to *A. minutum* exhibited reproducible valve activity changes under our experimental test conditions. Consequently, the above data set clearly

shows that the presence of *A. minutum*, at ecologically relevant concentrations is a strong behavior drive in the oyster *C. gigas*.

#### 4. Discussion

The objective of this work was to test under laboratory conditions how an exposure to the dinoflagellate *A. minutum* in a bloom simulation could induce a change in valve activity behavior in Pacific oysters, *C. gigas*. Valve activity recording and behavioral parameters to test water quality have been available for years. The pioneering developments date back to the turn of the 20th century (Hopkins, 1931; Marceau, 1909; Nelson, 1921). This is not the place for an extensive review, but among the most-recent systems one can cite are those of Kittner and Riisgard (2005), Wilson et al. (2005), Frank et al. (2007) or Garcia-March et al. (2008). Some apparatus for measuring bivalve shell activity are commercially available (Borchering, 2006; Kramer and Foekema, 2001); however, valve activity can be measured in a number of different ways, and more work clearly remains to be performed in terms of screening the behavioral repertoire in bivalves under both laboratory and field conditions. Specifically the existence of a significant range of behavioral flexibility in the face of environmental changes or stressors remains to be described.

Our results show that *C. gigas* exposed to an *A. minutum* concentration of  $\approx 3500$  cell  $\text{ml}^{-1}$  for 7 days exhibited valve behavior different from that of oysters exposed to the non-toxic algae *T. iso* and *H. triquetra*. *C. gigas* remained open longer, the amplitude of valve opening was reduced, and the number of micro-closures increased when exposed to *A. minutum*. These experiments were repeated twice (experiments 1 and 2), within an interval of 2 months, and similar results were obtained in both trials. This strongly suggests that oysters, with regard to measurable behavior, can exhibit the stability and reproducibility that is required under appropriate experimental protocols.

What can be ascertained about the physiological mechanisms underlying the behavioral changes we described? The reason for such a valve activity change remains today a matter of speculation, although a likely explanation has a neural basis that is possibly partially documented. Indeed, it is known that PSP toxins cause impairment and sometimes fatalities by blocking sodium conductance in nerve fibers (Narahashi and Moore, 1968). In the softshell clam *Mya arenaria*, Bricelj et al. (2005) reported that burrowing incapacitation was induced by paralytic shellfish toxin (PST) and associated with muscle paralysis. Furthermore, these authors demonstrated that reduction in sensitivity of *Mya arenaria* to these toxins is the result of a single amino acid substitution in the sodium-channel pore region that changes the STX-binding capacity. More generally, genetic variation involving sodium-channel pore micro-anatomy possibly explains the existence

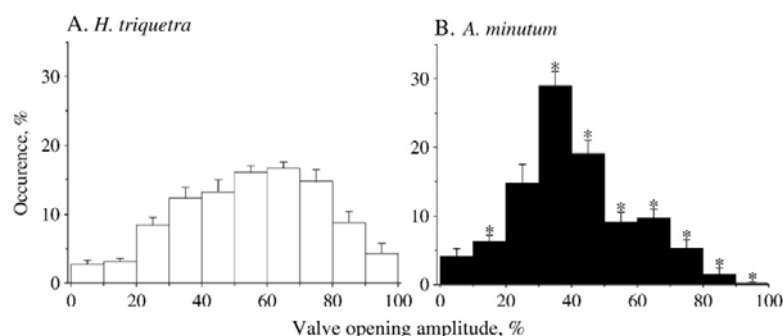


Fig. 7. Experiment 2. Occurrence in percentage of valve opening amplitude (10 ranges from 0 to 100% of amplitude) of *C. gigas* during the 7-day test experiment. A. Control, oysters fed with *Heterocapsa triquetra*. B. Oysters exposed to *Alexandrium minutum*. Mean  $\pm$  standard error,  $n = 8$ . \* Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the same range in the control condition.



of PSP non-resistant and resistant bivalve species. Resistant shellfish are insensitive to PSP toxins and do not modify filtration rate or valve activity. On one hand, resistant species, such as *Mytilus edulis*, accumulate phycotoxins in tissues at greater rates than sensitive bivalves (Bricelj et al., 1990). On the other hand, highly-sensitive bivalve species, such as the clam *Mercenaria mercenaria* or the scallop *Argopecten irradians*, exhibit physiological and behavioral mechanisms to avoid toxicity by reducing filtration rate and rapid shell clapping to clear the gills of toxic cells (Gainey and Shumway, 1988). *C. gigas* is described as an intermediate species in terms of sensitivity to PSP toxins (Bricelj and Shumway, 1998). This intermediate status possibly explains why *A. minutum* exposure significantly impacts *C. gigas* behavior (as measured by valve activity) without killing the oysters. Several studies already have shown physiological responses of *C. gigas* to *Alexandrium* sp. Specifically, it has been reported that *C. gigas* reduces filtration, ingestion, and biodeposition rates when exposed to *Alexandrium* sp. (Bardouil et al., 1993; Bougrier et al., 2003; Dupuy and Sparks, 1967; Laabir and Gentien, 1999; Lassus et al., 1996, 1999, 2004). In the same way of our results, a study on the pearl oyster *Pinctada fucata* (Nagai et al. 2006) and on the clam *Ruditapes philippinarum* (Basti et al. 2009) valve behavior showed that exposed to the harmful algae dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*, these bivalves also increased their daily valve micro-closure, without valve closure except at high algae concentration.

As stated above, paralytic shellfish toxins induce a reversible but highly-specific block of ion transport by the sodium channels. The complex behavioral change we observed might be explained by this physiological mechanism acting at various levels within the oyster. In the whole animal, mode of PSP toxin action could have decreased or eliminated the action potential at synaptic levels and could induce a partial or total paralysis of muscle fibers. Hégaret et al. (2007) reported a paralysis of the adductor muscle of *C. gigas* and *C. virginica* upon exposure to *A. catenella* and *A. fundyense*, respectively. Similarly, mussels had paralyzed adductor muscles when exposed to *A. fundyense* after spawning events (Galimany et al., 2008). Moreover, Hégaret et al. (2009) describe myopathy (characterized by atrophy, myodegeneration and hyaline degeneration) in muscle Manila clams exposed to *Prorocentrum minimum*. Similar myopathology were observed in adductor muscle of *C. gigas* exposed to *A. minutum* (Haberkorn et al. unpublished data). Such muscular alterations can also be expected to modify valve activity of bivalves.

One can also suggest that muscular fibers of gills (Medler and Silverman, 2001) could be the targets of PSP toxins. This could then lead to a decrease in pumping processes and respiratory efficiency. Thus, reduction of *C. gigas* filtration rate during exposure to *Alexandrium* sp. may not be directly related to the avoidance of the toxic algae alone as generally argued (Bougrier et al., 2003; Lassus et al., 1999, 2004), but also to gill and/or muscle paralysis. At this point, the biological significance of observed changes in valve activity of oysters upon *A. minutum* exposure remains unclear. Two hypotheses that are not mutually exclusive can be proposed. Valve behavior changes may result from i) an avoidance response after “physical” contact between *Alexandrium* cells and external organs and/or ii) internal contamination by toxins released after *A. minutum* cell digestion. The fact that behavioral changes appeared fairly rapidly upon *A. minutum* exposure might support the former hypothesis of an avoidance response. On the other hand, approximately five days are needed for the *A. minutum*-exposed oysters to recover “normal” valve behavior. This suggests that the observed behavior responses is related to toxin accumulation, as it generally takes 4–6 days for PST contaminated oysters to depurate (Gueguen et al., 2008), supporting thus the second hypothesis.

In short, explanation for the behavior we report could be a consequence of both internal contamination by PSP toxins, and protective behavior to avoid contamination. These are today's speculations that present exciting challenges for future experiments to test these hypotheses.

It has also to be highlighted that PST may not be the only toxin produced by *A. minutum* that affect oyster behavior. Indeed, *Alexandrium* species are known to produce other toxic compounds, such as ichthyotoxins (Emura et al., 2004) and allelochemicals (Arzul et al., 1999; Tillmann et al., 2007). It has been reported that *A. minutum* showed potent toxic effects upon brine shrimp *Artemia salina* (Lush et al., 1996) and a harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons* (Bagoien et al., 1996), independently of paralytic-toxin effects. Moreover, Ford et al. (2008) found no measurable effect of a PST-producing strain of *Alexandrium tamarense* on hemocytes of two clam species. Instead, the extract from a non-PST-producing strain had a stronger and consistent negative effect on hemocytes, compared to a PST-producing strain and filtered seawater controls.

Nevertheless, the present data allow some comparisons with exposures to other stressors such as contaminants that were also performed under similar laboratory conditions. Interestingly, response to *A. minutum* appears to be different than behavioral responses to trace metals for example. Upon metal exposure, bivalves react rapidly by closing shells to avoid contact with the pollutant (Bouget and Mazurie, 1997; Doherty et al., 1987; Markich et al., 2000; Kramer et al., 1989; Tran et al., 2003). One reason for the different responses to metals and *A. minutum* could be because *A. minutum* is also a putative phytoplankton food supply for bivalves. The oysters might have to make a compromise between nutritional needs and algal toxicity, although a behavioral disturbance is apparent from the increase in micro-closure and decrease in valve amplitude during *A. minutum* exposure. The valve response to *A. minutum* is also different from the physiological response associated with respiratory needs, and specifically to lack of oxygen. Different hypoxic levels, i.e. oxygenation status below air equilibration but not zero oxygen, are characterized by increased valve opening duration (Tran et al., 2005) that is associated with increased ventilation to maintain constant O<sub>2</sub>-consumption and blood-oxygenation levels (Tran et al., 2000). The observed behavioral change is also different from the Pacific oyster valve behavior reported during gametogenesis. His (1970) showed that, during spawning, *C. gigas* maintains the shell widely open with a series of brief closures to expulse the gametes outside of the pallial cavity. The increased number of micro-closures recalls previously described stress behavior reported in the freshwater clam *Corbicula fluminea* when first exposed to a new laboratory environment (Tran et al., 2003). Although the results obtained are preliminary, the approach developed in this study (use of vibration-free tables to reduce the occurrence of false responses, of lightweight impedance electrodes, long term acclimation periods, and isolated rooms) is complementary of other physiological and biochemical measurements used to assess the potential impact of harmful algae on bivalve biology.

Thus, to further validate valve activity as a pertinent behavioral and physiological variable it must be combined it with “classical” physiological measurements (filtration, respiration). Also, in the context of phycotoxin contamination, it would be relevant to investigate relationships between toxin accumulations and valve activity at the individual level. As shown in the data presented here, individual variability in valve activity is wide, as is the case for most of physiological measurements in bivalves. We speculate that valve activity measurement may contribute to an understanding of individual variability in toxin accumulation. Moreover, in the future, it could be productive to test whether or not valve activity changes are dose-dependent responses or all-or-none responses.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Gilles Durrieu and Mohamedou Sow for their help and discussions about the HFNI valvometer and Christine Schwimmer for the correction of English language. Thank you to Gary Wikfors for stimulating and constructive remarks. All



experiments presented in this paper complied with the law in effect in France, where they were performed.

## References

- Arzul, G., Seguel, M., Guzman, L., Erard-Le Denn, E., 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232, 285–295.
- Bagoien, E., Miranda, A., Reguera, B., Franco, J.M., 1996. Effects of two paralytic shellfish toxins producing dinoflagellates on the pelagic harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons*. *Mar. Biol.* 126, 361–369.
- Balech, E., 1990. Four new dinoflagellates. *Helgol. Meeresunters.* 44, 387–396.
- Bardouil, M., Bohec, M., Cormerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993. Experimental study of the effect of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* 12, 417–422.
- Basti, L., Nagai, K., Shimazaki, Y., Yuji Oshima, Y., Honjo, T., Segawa, S., 2009. Effects of the toxic dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the valve movement behaviour of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 291, 41–47.
- Belin, C., Raffin, B., 1998. Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995, résultats du REPHY (Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines). REPHY report. Ifremer, France, p. 143.
- Borchering, J., 2006. Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor, a biological early warning system for continuous water quality monitoring. *Hydrobiologia* 556, 417–426.
- Bouget, J.-F., Mazurie, J., 1997. Dispositif de surveillance biologique de la qualité d'eau d'un site conchylicole estuarien utilisant un biocapteur valvaire muni d'huîtres et de moules. *Tech. Sci. Méthodes* 11, 71–79.
- Bougrier, S., Lassus, P., Bardouil, M., Masselin, P., Truquet, P., 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yield and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquat. Living Resour.* 16, 347–352.
- Bricelj, V.M., Shumway, S.E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* 6, 315–383.
- Bricelj, V.M., Lee, J.H., Cembella, A.D., Anderson, D.M., 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63, 177–188.
- Bricelj, V.M., Lee, J.H., Cembella, A.D., 1991. Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog, *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 74, 33–46.
- Bricelj, V.M., Cembella, A.D., Laby, D., Shumway, S.E., Cucci, T.L., 1996. Comparative physiological and behavioral responses to PSP toxins in two bivalve mollusks, the softshell clam, *Mya arenaria* and surfclam, *Spisula solidissima*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 405–408.
- Bricelj, V.M., Connell, L., Konoki, K., Mac Quarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, A., Trainer, V.L., 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* 434, 763–766.
- Cembella, A.D., Todd, E., 1993. Seafood toxins of algal origin and their control in Canada. In: Falconer, E.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 129–144.
- Chambon, C., Legeay, A., Durrieu, G., Gonzalez, P., Ciret, P., Massabuau, J.-C., 2007. Influence of the parasite worm *Polydora* sp. on the behavior of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Mar. Biol.* 152, 329–338.
- Chang, F.H., Mackenzie, I., Till, D., Hannah, D., Rhodes, L., 1995. The first toxic shellfish outbreaks and the associated phytoplankton blooms in early 1993 in New Zealand. In: Lassus, P., Arzul, G., Gentien, P., Marcollou, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Publisher, Paris, pp. 145–150.
- Doherty, F.G., Cherry, D.S., Cairns Jr., J., 1987. Valve closure response of the Asiatic clam *Corbicula fluminea* exposed to cadmium and zinc. *Hydrobiologia* 153, 159–167.
- Dupuy, J.L., Sparks, A.K., 1967. *Gonyaulax washingtonensis*, its relationship to *Mytilus californianus* and *Crassostrea gigas* as a source of PSP toxin in Sequim bay, Washington. *Proc. Natl. Shellfish. Ass.* 58, 2–12.
- Emura, A., Matsuyama, Y., Oda, T., 2004. Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori*. *Harmful Algae* 3, 29–37.
- Ford, S.E., Bricelj, V.M., Lambert, C., Paillard, C., 2008. Deleterious effects of a non PST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarense* on bivalve hemocytes. *Mar. Biol.* 154, 241–253.
- Frank, D.M., Hamilton, J.F., Ward, J.E., Shumway, S., 2007. A fiber optic sensor for high resolution measurement and continuous monitoring of valve gape in bivalve molluscs. *J. Shellfish Res.* 26, 575–580.
- Gainey, L.F., Shumway, S.E., 1988. A compendium of the response of bivalve mollusks to toxic dinoflagellates. *J. Shellfish Res.* 7, 623–628.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae* 7, 702–711.
- García-March, J.R., Sanchis Solsona, M.A., García-Carrascosa, A.M., 2008. Shell gaping behavior of *Pinna nobilis* L., 1758: circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Mar. Biol.* 153, 689–698.
- Gueguen, M., Bardouil, M., Baron, R., Lassus, P., Truquet, P., Massardier, J., Amzil, Z., 2008. Detoxification of pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat. Living Resour.* 21, 13–20.
- Halim, Y., 1960. *Alexandrium minutum*, nov. gen. nov. sp. Dinoflagellé provocant des «eaux rouges». *Vie Milieu* 11, 102–105.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79–99.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Lambert, C., Shumway, S.E., Bérard, J.B., Lassus, P., 2007. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have little apparent effect on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* 141, 441–447.
- Hégaret, H., da Silva, P., Sunila, I., Dixon, M.S., Alix, J., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2009. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 371, 112–120.
- His, E., 1970. L'émission des gamètes chez l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* LMK). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 34, 17–22.
- Hopkins, A.E., 1931. Temperature and shell movements of the oyster (*Ostrea gigas*). *Bull. U.S. Bur. Fish.* 47, 1–14.
- Kittner, C., Riisgard, H.U., 2005. Effect of temperature on filtration rate in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for temperature compensation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 305, 147–152.
- Kramer, K.J.M., Foekema, E.M., 2001. The "Musselmonitor" as biological early warning system: the first decade. In: Butterworth, F.M., Gensebatt, Bonaparte, M.E., Gunatilaka, A. (Eds.), *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: A handbook*, vol. II. Plenum, New York, pp. 59–87.
- Kramer, K.J.M., Jenner, H.A., De Zwart, D., 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia* 188/189, 433–443.
- Laabir, M., Gentien, P., 1999. Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 18, 217–222.
- Lassus, P., Wildish, J., Bardouil, M., Martin, J.L., Bohec, M., Bougrier, S., 1996. Ecophysiological study of toxic *Alexandrium* spp. Effects on the oyster *Crassostrea gigas*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 409–412.
- Lassus, P., Bardouil, M., Beliaeff, B., Masselin, P., Naviner, M., Truquet, P., 1999. Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Balim on the feeding behavior of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.* 18, 211–216.
- Lassus, P., Baron, R., Garen, P., Truquet, P., Masselin, P., Bardouil, M., Leguay, D., Amzil, Z., 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: environmental factors affecting toxin uptake in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 17, 207–214.
- Lush, G.J., Hallegraeff, G.M., Munday, B.L., 1996. High toxicity of the red tide dinoflagellate *Alexandrium minutum* to the brine shrimp *Artemia salina*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and toxic algal blooms*. UNESCO, Paris, pp. 389–392.
- Marceau, F., 1909. Recherche sur la morphologie, l'histologie et la physiologie comparée des muscles adducteurs des mollusques acéphales. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 2 (ser 5), 295–469.
- Marie, D., Partensky, F., Vaulot, D., Brussaard, C., 1999. Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. In: Robinson, J.P. (Ed.), *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons Inc, New York, pp. 11.11.11–11.11.15.
- Markich, S.J., Brown, P.L., Jeffree, R.A., Lim, R.P., 2000. Valve movement responses of *Vesutinus angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: an exception to the free ion activity model. *Aquat. Toxicol.* 51, 155–175.
- Medler, S., Silverman, H., 2001. Muscular alteration of gill geometry in vitro: implications for bivalve pumping processes. *Biol. Bull.* 200, 77–86.
- Nagai, K., Honjo, T., Go, J., Yamashita, H., Jin Oh, S., 2006. Detecting the shellfish killer *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) by measuring bivalve valve activity with a Hall element sensor. *Aquaculture* 255, 395–401.
- Narahashi, T., Moore, J.W., 1968. Neuroactive agents and nerve membrane conductances. *J. Gen. Physiol.* 51, 93–101.
- Nelson, T.C., 1921. Report of the department of Biology of the New Jersey Agricultural College Experiment Station, New Brunswick, N.J. for the year ending June 30th 1920. Publ. by the State, Trenton N.J. pp. 317–349.
- Page, F.H., Martin, J.L., Hanke, A., 2001. Annual timing of phytoplankton blooms in the western Bay of Fundy. Environmental studies for Sustainable Aquaculture (ESSA). 2001 workshop report. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci., vol. 2352, pp. 16–18.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behavior of bivalve mollusks. *Aquat. Toxicol.* 10, 9–27.
- Tillmann, U., Alpermann, T., John, U., Cembella, A., 2007. Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists. *Harmful Algae* 7, 52–64.
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.-C., 2000. Mechanism of oxygen consumption maintenance under varying levels of oxygenation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can. J. Zool.* 78, 2027–2036.
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 116–122.
- Tran, D., Bourdineaud, J.-P., Massabuau, J.-C., Garnier-Laplace, J., 2005. Modulation of uranium bioaccumulation by hypoxia in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: induction of multixenobiotic resistance protein and heat shock protein 60 in gill tissues. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2278–2284.
- Wilson, R., Reuter, P., Wahl, M., 2005. Muscling in on mussels: new insights into bivalve behaviour using vertebrate remote sensing technology. *Mar. Biol.* 147, 1165–1172.

## 2.3. Article 3 – Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, exposed to *Alexandrium minutum*



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/marpolbul](http://www.elsevier.com/locate/marpolbul)



### Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*

Hansy Haberkorn<sup>a</sup>, Damien Tran<sup>b</sup>, Jean-Charles Massabau<sup>b</sup>, Pierre Ciret<sup>b</sup>, Véronique Savar<sup>c</sup>,  
Philippe Soudant<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

<sup>b</sup> Université Bordeaux 1, CNRS, UMR 5805 EPOC, Place du Dr Peyneau, 33120, Arcachon, France

<sup>c</sup> IFREMER Centre de Nantes, Laboratoire Phycotoxines, BP 21105, 44311 Nantes, France

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Harmful algae  
Oysters  
Behavioral responses  
Algae concentration  
Toxin accumulation

#### ABSTRACT

The complexity of the relationships between *Alexandrium minutum* (*A.m.*) concentration in the water ( $[A.m.]_w$ ), Paralytic Shellfish Poisoning contamination in the digestive gland ( $[PSP]_{dg}$ ) and valve behavior was explored in oysters *Crassostrea gigas*. Two experiments were conducted, during which oysters' valve behaviour were analyzed. Oysters, first acclimated for 10-days with the non harmful microalgae *Heterocapsa triquetra* (*H.t.*), were exposed to four microalgae mixtures at constant total concentrations of  $10 \times 10^3$  cells  $ml^{-1}$  (experiment-1) and  $5 \times 10^3$  cells  $ml^{-1}$  (experiment-2): 100% *A.m.*; 50% *A.m.*–50% *H.t.*; 25% *A.m.*–75% *H.t.*; 100% *H.t.* At the end of experiment-2,  $[PSP]_{dg}$  were measured.

At  $10 \times 10^3$  cells  $ml^{-1}$ , the microalgal ingestion decreased ( $p < 0.05$ ) with increasing  $[A.m.]_w$  but not at  $5 \times 10^3$  cells  $ml^{-1}$  ( $p > 0.05$ ). The frequency of microclosures specifically increased with  $[A.m.]_w$  ( $p < 0.05$ ) and the opening duration with  $[PSP]_{dg}$  ( $p < 0.0001$ ). Oysters exhibiting the maximum increase in opening duration also exhibited the highest  $[PSP]_{dg}$ . The results are discussed in terms of oyster physiology and origin of the behavioral response.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Recent studies have tested modification of shell valve activity in bivalves following harmful microalgal exposure (Nagai et al., 2006; Basti et al., 2009; Tran et al., 2010). The scallop *Pinctada fucata* exposed to *Heterocapsa circularisquama* showed an increased frequency of valve adductions or microclosures (Nagai et al., 2006). Similarly, *Ruditapes philippinarum* increased the frequency of valve adductions and decreased amplitude of valve openings upon exposure to *H. circularisquama* (Basti et al., 2009). In oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to *Alexandrium minutum*, Tran et al. (2010) also described an increased frequency of microclosures as well as an increase in valve-opening duration. This increased interest in behavioral responses has two major aims: to improve our understanding of the physiological impact of harmful microalgae on bivalve physiology and ecology; to test the putative interest of behavioral change to detect the presence of harmful

microalgae or to monitor depuration processes in the field and oyster farms. However, much remains to explore, both in the lab and in the field. The aim of the present study was to gain more insights into the relationship between *C. gigas* behavior, characterized by shell valve activity, concentration of the harmful microalgae *A. minutum* in the ambient water and accumulation of PSPs in the digestive gland.

Among harmful microalgae, *Alexandrium* species are known to produce Paralytic Shellfish Toxins (PSPs). Several commercial bivalve species, such as oysters and mussels, accumulate PSPs by feeding on phytoplanktonic PSP producers (Oshima et al., 1990; Bricelj and Shumway, 1998). PSP accumulation and detoxification kinetics, as well as biotransformation of the toxins, were reviewed in Bricelj and Shumway (1998) and have been well documented for the oyster, *C. gigas*, exposed to *A. minutum* or *A. catenella* (Lassus et al., 2005, 2007; Guéguen et al., 2008).

Beyond behavioral studies on valve activity, authors have mainly focused on bivalve feeding and/or digestive responses (Bardouil et al., 1993; Wildish et al., 1998; Li et al., 2001; Bougrier et al., 2003; Lassus et al., 2004; Navarro et al., 2008; Fernández-Reiriz et al., 2008). In the oyster, *C. gigas* (Bardouil et al., 1993; Wildish et al., 1998; Lassus et al., 2004) and mussel, *Mytilus chilensis*,

\* Corresponding author.

E-mail address: [philippe.soudant@univ-brest.fr](mailto:philippe.soudant@univ-brest.fr) (P. Soudant).



(Navarro et al., 2008) an inhibition of feeding activity was reported when animals were exposed to harmful *Alexandrium* species. In *M. chilensis* exposed to *A. catenella*, the inhibition appeared to be reversible after a few days, even though exposure continued, suggesting that mussels can acclimate to feeding on toxic microalgae (Navarro et al., 2008).

Relationships between the accumulation potential of different bivalve species for PSPs and the ingestion and absorption rates were described by Bricelj et al. (1990) and Bricelj and Shumway (1998). These studies demonstrated an inverse relationship between sensitivity to toxin and potential toxin accumulation. For example, the oyster *Crassostrea virginica*, with high nerve sensitivity to PSPs, potentially accumulates fewer toxins by decreasing ingestion and absorption rates (Bricelj and Shumway, 1998). On the contrary, the mussel *Mytilus edulis*, which has low nerve sensitivity to PSPs, accumulates a higher amount of toxins. Another level of complexity has been discussed by Lassus et al. (2000) at the intra-population level. In *C. gigas* exposed to *A. minutum*, they suggested that the variability of contamination status could be related to inter-individual differences in valve and/or clearance activities. This inter-individual variability was used by Bougrier et al. (2003) to investigate the relationship between PSP content and clearance rates of *C. gigas* exposed to *A. minutum*.

The objective of this work was to go further to the previous study performed by Tran et al. (2010) by (i) exposing oysters to different concentrations of *A. minutum* and (ii) measuring PSP concentrations in oyster digestive glands. This allows evaluating if behavioral responses of the Pacific oyster *C. gigas* are related to the presence and concentration of harmful microalgae in water and/or to toxin concentration in their digestive gland. This is part of a more general work in which the impact of toxic micro-algae on bivalves physiology and the underlying mechanisms explaining behavior variability in the field are studied (Schmitt et al., 2011; Tran et al., 2011).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Oyster characteristics

Two experiments were carried out at two different periods, in November–December (experiment 1) and January–February (experiment 2), with Pacific oysters, *C. gigas* at the University of Brest. Oysters were obtained from a shellfish farmer in the bay of Brest (France). Two homogenous groups of oysters ( $n = 32$  per experiment) were chosen *a priori* according to the shell length (75 mm shell length,  $40 \pm 1$  g total weight). No death was observed during the experiments.

### 2.2. Microalgal cultures

The dinoflagellate *A. minutum* (Halim, strain AM89BM) was grown in 10-L batch cultures using autoclaved seawater filtered to  $1 \mu\text{m}$  and supplemented with L1 enrichment (Guillard and Hargraves, 1993). Cultures were maintained at  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $100 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , with a dark:light cycle of 12:12 h. *A. minutum* was harvested after 12 days, while still in the exponential growth phase under our conditions. At this age, this strain produced  $1.3 \pm 0.1$  pg eq. STX per cell, as measured by the method of Oshima (1995).

The dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* (strain HT99PZ - Ehrenberg, 1840) was grown in 10-L batch cultures in autoclaved,  $1 \mu\text{m}$ -filtered seawater enriched with L1 nutrients. Cultures were maintained for 5 days at  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $100 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , with a dark:light cycle of 12:12 h.

### 2.3. Experimental procedure for oyster exposure

The non-toxic dinoflagellate *H. triquetra* was chosen as a control because of its similarity to *A. minutum*, in terms of size and shape characteristics: *H. triquetra* cell size ( $19\text{--}28 \mu\text{m}$ ) is similar to *A. minutum* cell size ( $23\text{--}29 \mu\text{m}$ ). Importantly, *A. minutum* and *H. triquetra* have different green auto-fluorescence characteristics which allow their individual quantification in mixtures.

The experiments were conducted in an isolated room with minimal human activity to limit inadvertent stimulation of oysters. Experimental tanks were installed on antivibrating benches to minimize any external disturbance that could interfere with the behavior of the oysters. Experiments were carried out with a photoperiod of 12 h light/12 h dark and seawater was maintained at a temperature of  $16 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prior to the experiments, oysters were distributed randomly into eight 10-L tanks with four oysters per tank. Oysters were maintained in the same tanks during the entire experiment to avoid behavioral disturbance from handling. Each tank was individually supplied with cultured microalgal suspensions using a multichannel peristaltic pump. Central air-lifts were used to homogenize microalgal concentration and water in the tanks. Present experiments were performed at two different total microalgal concentrations ( $10 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  and  $5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ), which correspond with bloom concentrations observed on French coast (Belin and Raffin, 1998).

#### 2.3.1. Experiment 1

As a first step to characterize a relationship between concentration of *A. minutum* in water and behavior of oysters, oysters were exposed to four different microalgal mixtures, at an identical total concentration of microalgae of  $10 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Three different phases were considered: acclimation period (Acc.;  $t_0\text{--}t_{10}$ ), exposure period (Exp.;  $t_{11}\text{--}t_{12}$ ) and recovery period (Rec.;  $t_{13}\text{--}t_{18}$ ). During the 10-days acclimation period, each tank received a continuous flow of  $12.5 \text{ L day}^{-1}$  of seawater (filtered to  $0.5 \mu\text{m}$ ) with *H. triquetra* at  $1 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Following the acclimation period, four supply tanks were used to distribute microalgal suspensions into the respective, replicated experimental tanks (two tanks per condition). Supply tanks were prepared with each of four microalgal mixtures: (i) 100% *A. minutum* ( $1 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ), (ii) 50% *A. minutum*–50% *H. triquetra* ( $5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *A. minutum* and  $5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *H. triquetra*), (iii) 25% *A. minutum*–75% *H. triquetra* ( $2.5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *A. minutum* and  $7.5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *H. triquetra*) and (iv) 100% *H. triquetra* ( $1 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ). Each tank received a continuous flow of  $12.5 \text{ L day}^{-1}$  of each microalgal treatment. The exposure period continued for two days, followed by five days of recovery ( $12.5 \text{ L day}^{-1}$  of seawater with *H. triquetra* at  $1 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ).

#### 2.3.2. Experiment 2

To test the possible relationship between behavior and toxin accumulation, toxin contents in the digestive glands of the oysters were determined at the end of the exposure period. Two different phases were considered: acclimation period (Acc.;  $t_0\text{--}t_{10}$ ) and a 5-days exposure period (Exp.;  $t_{11}\text{--}t_{15}$ ). During the 10-days acclimation period, each tank received a continuous flow of  $12.5 \text{ L day}^{-1}$  ( $8.7 \text{ mL min}^{-1}$ ) of seawater (filtered to  $0.5 \mu\text{m}$ ) with *H. triquetra* at  $5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Following the acclimation period, four microalgal supply tanks were used to distribute microalgal suspensions into the respective, replicated experimental tanks (two tanks per condition). Supply tanks were prepared with each of four microalgal mixtures: (i) 100% *A. minutum* ( $5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ), (ii) 50% *A. minutum*–50% *H. triquetra* ( $2.5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *A. minutum* and  $2.5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *H. triquetra*), (iii) 25% *A. minutum*–75% *H. triquetra* ( $1.25 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *A. minutum* and  $3.75 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *H. triquetra*) and (iv)

100% *H. triquetra* ( $5 \times 10^3$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ). Each tank received a continuous flow of  $12.5 \text{ L day}^{-1}$  of each microalgal treatment. At the end of the exposure period, the digestive glands of individual oysters were dissected, weighed, frozen immediately in liquid nitrogen, and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Later, digestive glands were ground with a “Dangoumeau” homogenizer into liquid nitrogen and this sample was used to measure toxin content.

#### 2.4. *C. gigas* valve-activity measurement

To evaluate the effect of *A. minutum* on the valve behavior of *C. gigas* throughout the experiment, we recorded the valve activity continuously with a laboratory made valvometer. The oysters were equipped (at  $t_0$ ) with light weight ( $\approx 1 \text{ g}$ ) electromagnetic electrodes glued onto both shells. The electrodes allow the oysters to move their valves without constraint. More details are described in Tran et al. (2003) and Chambon et al. (2007), as well as data about the required adaptation periods before experimental set-up (Tran et al., 2003). The record of valve activity started at  $t_0$ .

The free ends of the electrodes were connected to an electronic apparatus composed mainly of a multiplexer that switched the current every 300 ms from one pair of electrodes to another, and a computer driving the apparatus via a data acquisition card (LAB PC 1200; National Instruments, Austin, TX, USA), using LabView 8.0 software (National Instruments).

#### 2.5. Phytoplankton sampling

During exposure periods, 1-ml water samples were collected from supply tanks, both at the input and within the oyster tanks, in order to determine microalgal cell densities. Samples were collected and fixed in 3% formaldehyde (final concentration) at 1, 3, 5, 6, 7, 23, 24, 27 and 30 h after the beginning of the exposure for experiment 1 and at 1, 15, 17, 20, 24, 26, 40, 48 and 64 h for experiment 2. Samples were analyzed by flow cytometry within one day of sampling.

#### 2.6. Measurements of dinoflagellate cell densities by flow cytometry

Measurements of dinoflagellate cell concentrations were performed using a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometer (FCM) equipped with a 488 nm argon laser. Thresh-

old was set to FL3 (red fluorescence, 550–600 nm) to detect only chlorophyll-containing cells. Settings were adjusted to visualize dinoflagellate cells on two cytograms with (i) Forward Scatter (FSC, related to cell size) vs Side Scatter (SSC, related to cell internal complexity), and (ii) red auto-fluorescence (FL3) vs green auto-fluorescence (FL1) as parameters. Cells of *A. minutum* and *H. triquetra* possess similar FSC and SSC characteristics, but *A. minutum* has higher FL1 in comparison to *H. triquetra*, making the two cells distinguishable in a mixed suspension. Cell densities were estimated from flow-rate measurement of the flow-cytometer (Marie et al., 1999), as all samples were run for 1 min. Results were expressed as number of cells per ml.

#### 2.7. Toxin content

Digestive gland (ground, 0.5 g) was extracted in 1 ml of 0.1 N HCl (2 v/w) at  $4^\circ\text{C}$ . After centrifugation (3000g, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ), pH of extracts was adjusted to 3.0 with 12 N HCl. After half-dilution, supernatants were ultra-filtered (20 kDa, Sartorius Centriscart) and stored at  $4^\circ\text{C}$  until analysis. PSPs were analyzed by ion-pairing, high-performance liquid chromatography (IP-HPLC) according to the method of Oshima (1995). The molar concentration ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) was converted into  $\mu\text{g STX equiv. } 100 \text{ g}^{-1}$  of digestive gland by using the conversion factors of Oshima (1995). Results were expressed in  $\mu\text{g STX equiv. } 100 \text{ g}^{-1}$  of digestive gland wet weight.

#### 2.8. Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  confidence interval (CI). Differences between variables before and during *A. minutum* exposure were determined using the T-test, after checking assumptions (normality and homoscedasticity of the error term).

Homogenous groups were identified using multiple range comparison tests (ANOVA) to determine which means were significantly different from which others and Fisher's least significant difference (LSD) procedure discriminated among the means. On graphics, the same letter was used for means which were not statistically different.

A statistical regression was used to correlate toxin content and behavioral variables. The fit between predicted and measured values was tested statistically using ANOVA. For all statistical results, a probability of  $p < 0.05$  was considered significant. Statistical

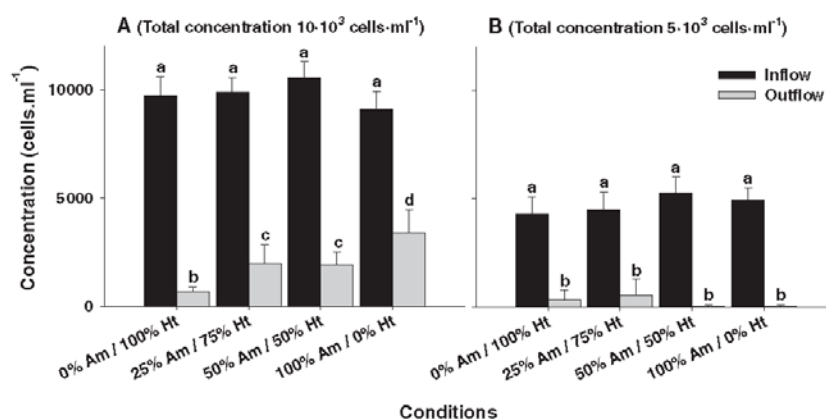


Fig. 1. Total microalgae concentrations measured in the inflow (black bars) and outflow (grey bars) of experimental tanks, for different experimental conditions, during experiments 1 (A) and 2 (B). Mean  $\pm$  confidence interval,  $n = 8$  samples per condition. Letters (a, b, c and d) represent four homogenous groups, identified using multiple range comparison tests whenever ANOVA was significant.

analyses were performed using Statgraphics Plus (Manugistics, Inc, Rockville, MD, USA).

### 3. Results

Under acclimation conditions, in tanks fed with  $10 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  without *A. minutum*, oysters consumed  $92.5 \pm 4.6\%$  of the microalgae supplied in the tanks (Fig. 1A). This percentage decreased with increasing ratio of *A. minutum* added ( $79.5 \pm 9.9\%$  at 25% *A.m./75% H.t.*;  $81.7 \pm 6.8\%$  at 50% *A.m./50% H.t.* and  $48.8 \pm 12.6\%$  at 100% *A.m./0% H.t.*). On the contrary, when animals were fed with half the concentration of microalgae,  $5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , all microalgae were consumed, independent of the *Alexandrium* concentration in the input water (Fig. 1B). In all conditions, no microalgal sedimentation was observed and no noticeable amount of feces and/or pseudofeces were found in the tanks. Similar decreases of both microalgae in the mixture (*A. minutum* and *H. triquetra*) were measured showing that *C. gigas* fed equally on both species.

Fig. 2 illustrates the similarity and replicability of the present experimental conditions: no statistical difference was observed between any of the eight tanks that were running in parallel, during both acclimation conditions ( $p > 0.05$ ) or during the second day of recovery ( $p > 0.05$ ). Similarly, paired comparison between the two series of replicate did not reveal statistical difference. This allowed evidencing dose-response relationship between behavioral responses and water concentration of *A. minutum* in *C. gigas*. During the 2-days exposure period, the oysters exhibited significantly more valve micro-closures in the presence of *A. minutum* (see inserts in Fig. 2). The number of valve micro-closures was 3.5 times higher in the presence of 100% *A. minutum*, 3.1 times higher at 50% and 1.9 times higher at 25%, in relation to the acclimation period of the oysters in the same tanks. It is only following the exposure to 25% *A. minutum* that valve micro-closure was not significantly different from the acclimation period and the 2 days of recovery. Fig. 3 presents the mean values in the above series of replicates

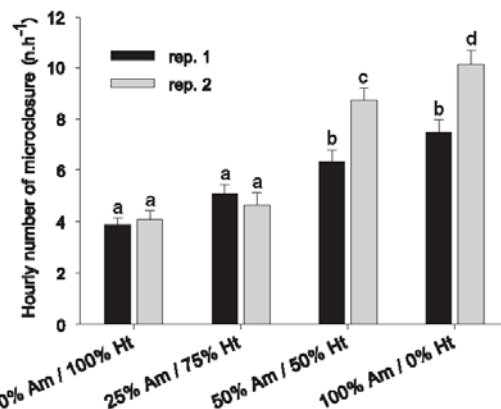


Fig. 3. Experiment 1, mean dose-response behavior. Mean frequency of valve micro-closures in oysters *C. gigas* exposed to different *A. minutum* concentrations in eight different experimental tanks running in parallel (four conditions and two replicates). Mean  $\pm$  confidence interval,  $n = 4$  oysters per tank. Letters (a, b, c and d) represent four homogenous groups, identified using multiple range comparison tests whenever ANOVA was significant.

(experiment 1) and demonstrates how the number of micro-closures statistically increased at higher *A. minutum* concentrations. During recovery, it significantly decreased towards acclimation values (see inserts in Fig. 2).

Fig. 4A and C shows the absence of a relationship between PSP concentration in the digestive gland and concentration of *A. minutum* in the water supplying the tanks ( $p > 0.05$ ) while Fig. 4B and D (data analysis either performed per oyster, 4B, or per tank, 4D) shows a positive correlation between toxin accumulation and daily opening duration. Fig. 5A and C demonstrate that the contamination status was not related to the opening-duration behavior prior exposure (mean value during the five last day acclimation period,

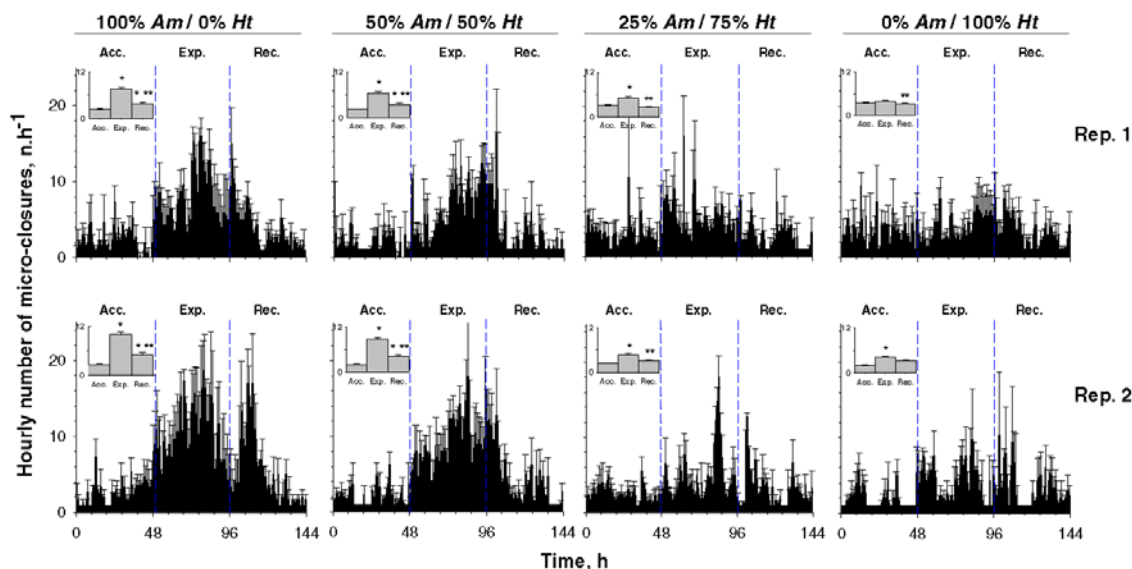
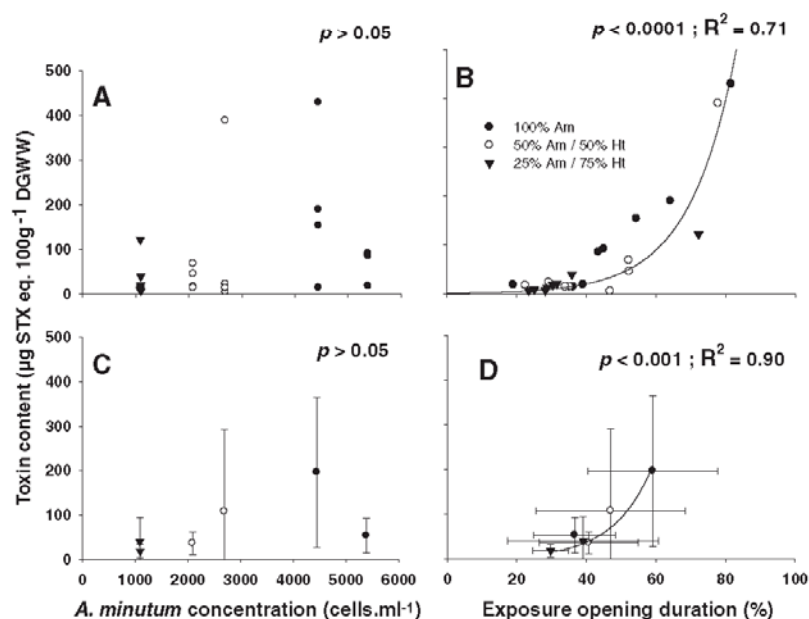
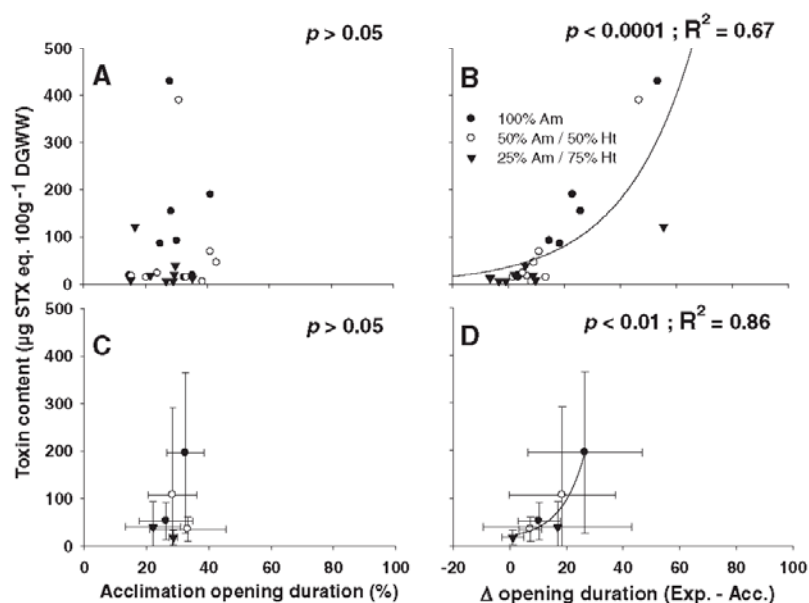


Fig. 2. Experiment 1. Dose-response behavior at various concentrations of *A. minutum* in the ambient water. Frequency of micro-closures, expressed in number per hour, in eight different experimental tanks running in parallel (four conditions and two replicates). Acc. (48 h of acclimation), Exp. (48 h of exposure) and Rec. (48 h of recovery). Mean  $\pm$  confidence interval,  $n = 4$  oysters per tank. \*significantly different from Acc., \*\*significantly different from Exp.





**Fig. 4.** Experiment 2, change of toxin contents in oysters, expressed as  $\mu\text{g STX eq. } 100\text{g}^{-1}$  digestive gland wet weight (DGWW), either per individual oyster (A, B) or experimental tank (C, D): toxin content as a function of (A and C) concentration of *A. minutum* in the inflow water and of (B and D) valve-opening duration. Five days of exposure duration; A, B,  $n = 24$  oysters; C, D,  $n = 6$  tanks, mean  $\pm$  confidence interval.



**Fig. 5.** Experiment 2, change of toxin contents in oysters, expressed as  $\mu\text{g STX eq. } 100\text{g}^{-1}$  digestive gland wet weight (DGWW), either per individual oyster (A and B) or experimental tank (C and D): toxin content as a function of (A and C) opening duration during acclimation period and of (B and D) difference of valve-opening duration between Exposure and Acclimation period (Exp.-Acc.). Five days of exposure duration; A, B,  $n = 24$  oysters; C, D,  $n = 6$  tanks, mean  $\pm$  confidence interval.

$p > 0.05$ ). This is coherent with the absence of significant difference within the whole set of reference and recovery conditions (low acclimation variability). This low variability completely vanished under exposure conditions. The more “responsive” animals (Fig

5B) or tanks (Fig. 5D), identified as those showing the most dramatic differences in daily opening duration between acclimation and exposure phases, were those exhibiting the highest accumulation of PSP in their digestive gland (Fig. 5B;  $p < 0.0001$ ,  $R^2 = 0.67$ ). A

comparison between the opening duration between the acclimation period (Fig. 5A, per individual, or 5C, per tank) and the exposure period (Fig. 4B, per individual, or 4D, per tank) shows a greatly increased variability in the presence of *A. minutum*. Under acclimation conditions the min–max values were 18–40% of opening duration while they were 19–85% with *A. minutum*.

#### 4. Discussion

The objective of this work was to evaluate if behavioral responses of the Pacific oyster *C. gigas* are related to the presence and concentration of harmful microalgae in water and/or to toxin concentration in their digestive gland. A dose–response relationship was observed between the frequency of micro-closures and the concentration of *A. minutum* in the ambient water but no dose–response relationship between micro-closures and the PSP concentration in the digestive gland. On the contrary, opening-duration showed a dose–response relationship to the PSP concentration in the digestive gland but not to the concentration of *A. minutum* in the water. In addition, data showed that the inter-individual variability of opening-duration increased during exposure in comparison to the acclimation period. Oysters exhibiting the largest increase in opening duration were those with the largest toxin content in the digestive gland. There was no relationship between acclimation and intensity of response during exposure as regard to the opening duration.

##### 4.1. Behavioral changes versus total microalgae concentrations

Present experiments were performed at two different total microalgal concentrations ( $10 \times 10^3$  cells  $\text{ml}^{-1}$  and  $5 \times 10^3$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ), with the aim to experimentally manipulate oyster feeding activity. Analysis of experiment 1 ( $10 \times 10^3$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) suggested that feeding activity slightly decrease with increasing proportion of *A. minutum* in the mixture. Such decreases of filtration rate were previously reported in *C. gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Bardouil et al., 1993) and *A. minutum* (Lassus et al., 1999). Lassus et al. (2004) also reported an inhibition effect at  $10 \times 10^3$  cells  $\text{ml}^{-1}$  in *C. gigas* fed with *A. minutum*. Present results showed that feeding was partly inhibited at  $10 \times 10^3$  cells  $\text{ml}^{-1}$  of *A. minutum* but not at  $5 \times 10^3$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . This could be the result of a balance between feeding requirements and a protective response.

##### 4.2. Impact of the *A. minutum* concentration in the water

Among the variables measured to describe oyster behavior, the frequency of valve micro-closures was positively correlated to the percentage of *A. minutum* added, at a constant total microalgae concentration. Tran et al. (2010), previously suggested that such behavior could be related to an avoidance response to minimize contact with harmful cells and/or effects of toxins released during digestion of *A. minutum* cells. This behavior could also help the animal to rapidly test the ambient water content (back and forth water movements across the mantle border and in the pallial cavity). The present report demonstrates that, in the present experimental conditions, this was associated to the concentration of *A. minutum* in the water and not to the PSP accumulation in the animal. Similar increases of valve micro-closures, correlated with increased concentrations of harmful microalgae, have been observed by Basti et al. (2009) in *R. philippinarum* exposed to *H. circularisquama*. The absence of PSP toxin production by *H. circularisquama* demonstrated that the presence of this toxin is not a prerequisite to induce an increase of micro-closures.

##### 4.3. Relationship with toxin concentration in the digestive gland

In *C. gigas*, 90% of PSP toxins are accumulate in the digestive gland (Guéguen et al., 2008; Lassus et al., 2007) explaining why PSPs were only analyzed in this organ. Present data showed that valve opening duration was dose-related to the concentration of PSP in the digestive gland. A comparison with previous reports shows that a positive relationship between feeding time and tissue PSP concentration was reported in *C. gigas* and *Pecten maximus* exposed to *A. minutum* (Bougrier et al., 2003). In this study, feeding time activity was indirectly evaluated by measuring the decrease in toxic cell density at the outlets of experimental tanks and biodeposit production. Although mean oyster responses to microalgal treatments and toxin accumulation are well documented in the literature, it is known that response intensity at the individual level is quite variable, from no change at all to very important and dramatic changes (see for examples Bricelj and Shumway, 1998; Lassus et al., 2007). This is also similar to PSP accumulation in *C. gigas*: numerous animals remained in the low range of the global distribution data while a minority accumulated the largest amounts (present report; Fig. 6 in Lassus et al., 2007). The present report demonstrates that this inter-individual variability of bioaccumulation was positively correlated to the opening duration during the exposure period (Fig. 4B and D) but not before it (Fig. 5A and C). Was the presence of larger quantities of PSP in the digestive gland responsible for the longer opening duration during exposure? Or, alternatively, was the longer opening duration, and incidentally a larger clearance value, responsible for a larger toxin bioaccumulation?

##### 4.4. The hen and egg problem

One must recall first that with *A. minutum* we are dealing with a paralyzing toxin, that we measured it in the digestive gland following a 5 day exposure period and that its distribution in the whole animal was presumably not time limited. Was the presence of larger quantities of PSP in the digestive gland responsible for the longer opening duration? Among the presently known physiological and behavioral alterations induced by PSP, are (i) alterations of action potential transmission by blocking sodium conductance in nerve fibers (Narahashi and Moore, 1968) and (ii) absence of response to mechanical stimulation of the gills and adductor muscle in gaping *C. virginica* (Hégaret et al., 2007). In the softshell clam *Mya arenaria*, Bricelj et al. (2005) reported muscle paralysis induced by paralytic shellfish toxin and in *C. gigas*, Haberkorn et al. (2010) described important morphological alterations of the adductor muscle. Physiological impacts could explain the larger opening durations. Alternatively, Tran et al. (2010) suggested muscular fibers of gills (Medler and Silverman, 2001) could be targets of PSP toxins. This could lead to a decrease in pumping efficiency in terms of volume of water ventilated per unit of time. Thus, a reduction of filtration efficiency during exposure to *A. minutum* would be compensated for by longer ventilatory periods in order to fulfill the animal's  $\text{O}_2$ -requirements and/or nutritional needs.

Was the longer opening duration, and a larger filtered volume of water, responsible for a larger toxin bioaccumulation? Feeding behavior was hypothesized by Bricelj and Shumway (1998) to be one of the parameters responsible for inter-individual variation in toxin accumulation. The present results show that in *C. gigas* there was no relationship between acclimation opening duration and contamination levels (Fig. 5A, 5C) nor between acclimation opening duration and animal reactivity (measured as exposure – acclimation opening duration) to *A. minutum*. On the contrary, present results suggest the existence of an inter-individual reactivity that may reflect differences in sensitivity to PSPs or to any other compounds or characteristics associated with *A. minutum*. In that



view, oysters accumulating the largest amounts of toxins could be considered less sensitive in comparison to oysters accumulating fewer toxins. This hypothesis has already been formulated by Bricelj and Shumway (1998) for different bivalve species. Bivalve species possessing low nerve sensitivity to PSP (e.g. *M. edulis*) were found to readily feed on toxic cells and thus accumulate high levels of toxins (Bricelj and Shumway, 1998). In contrast, oysters (e.g. *C. virginica*) described as PSP-sensitive species accumulated less PSP (Bricelj and Shumway, 1998). Differences in toxin accumulation (up to five times), observed between different populations of the same clam species, *M. arenaria*, and were related to intra-species variability, in terms of PSP sensitivity. A natural mutation of a single amino acid residue decreases affinity (1000-fold) of the saxitoxin-binding site in the sodium channel pore. This mutation was found to be responsible for the difference in nerve sensitivity between the two populations of *M. arenaria* exposed to PSP-producing *Alexandrium fundyense* (Bricelj et al., 2005). Furthermore, the present results underscore the possibility of finding differences in sensitivity to PSPs within an oyster stock (intra-population). Less-sensitive oysters would open their valves longer and would consume more toxic dinoflagellates. This is of course speculation but opens exciting research directions for the future.

To go further in understanding relationships between oysters behavior, toxin accumulation and *A. minutum* concentration in water, it would be interesting to use the same experimental design, but by maintaining constant *A. minutum* concentration during the whole exposure period. To better understand if behavioral changes were because of PSP content, oysters could be exposed to PSP producer *A. minutum* strain and non-PSP producer *A. minutum* strain.

#### Acknowledgments

We thank Marielle Guéguen and Patrick Lassus, for their advices and technical assistance. This study was carried out with the financial support of the National Research Agency (ANR), "MODECO-PHY" project 06SEST23 (2006–2009) and of the Brittany Region, "EPHYTOX" project. We also thank Aquitaine Region and the SME "EUKREA Electromatique" for financial support.

#### References

- Bardouil, M., Bohec, M., Cormerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* 12, 417–422.
- Basti, L., Nagai, K., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., Segawa, S., 2009. Effects of the toxic dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the valve movement behaviour of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 291, 41–47.
- Belin, C., Raffin, B., 1998. Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995, résultats du REPHY (Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines). REPHY Report, Ifremer, France, pp. 143.
- Bougrier, S., Lassus, P., Bardouil, M., Masselin, P., Truquet, P., 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquat. Living Resour.* 16, 347–352.
- Bricelj, V.M., Lee, J.H., Cembella, A.D., Anderson, D.M., 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63, 177–188.
- Bricelj, V.M., Shumway, S.E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Res. Fish. Sci.* 6, 315–383.
- Bricelj, V.M., Connell, L., Konoki, K., Mac-Quarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, W.A., Trainer, V.L., 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* 434, 763–767.
- Chambon, C., Legeay, A., Durrieu, G., Gonzalez, P., Ciret, P., Massabuau, J.-C., 2007. Influence of the parasite worm *Polychaeta* sp. on the behavior of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Mar. Biol.* 152, 329–338.
- Fernández-Reiriz, M.J., Navarro, J.M., Contreras, A.M., Labarta, U., 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquat. Toxicol.* 87, 245–251.
- Guéguen, M., Bardouil, M., Baron, R., Lassus, P., Truquet, P., Massardier, J., Amzil, Z., 2008. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat. Living Resour.* 21, 13–20.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234–236.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goff, N., Moal, J., Suquet, M., Guéguen, M., Sunila, I., Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 9, 427–439.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Lambert, C., Shumway, S.E., Bérard, J.B., Lassus, P., 2007. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have little apparent effect on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* 141, 441–447.
- Lassus, P., Bardouil, M., Beliaeff, B., Masselin, P., Naviner, M., Truquet, P., 1999. Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim on the feeding behavior of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.* 18, 211–216.
- Lassus, P., Bardouil, M., Masselin, P., Naviner, M., Truquet, P., 2000. Comparative efficiencies of different non-toxic microalgal diets in detoxification of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Nat. Toxins* 9, 1–12.
- Lassus, P., Baron, R., Garen, P., Truquet, P., Masselin, P., Bardouil, M., Leguay, D., Amzil, Z., 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 17, 207–214.
- Lassus, P., Bardouil, M., Baron, R., Bérard, J.B., Masselin, P., Truquet, P., Pitrat, J.P., 2005. Improving detoxification efficiency of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture Europe* 3, 6.
- Lassus, P., Amzil, Z., Baron, R., Séchet, V., Barillé, L., Abadie, E., Bardouil, M., Sibar, M., Truquet, P., Bérard, J.B., Guéguen, M., 2007. Modelling the accumulation of PSP toxins in Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii*. *Aquat. Living Resour.* 20, 59–67.
- Li, S.C., Wang, W.X., Hsieh, D., 2001. Feeding and absorption of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by two marine bivalves from the South China Sea. *Mar. Biol.* 139, 617–624.
- Marie, D., Partensky, F., Vaulot, D., Brussaard, C., 1999. Current Protocols in Cytometry, Chap. Enumeration of Phytoplankton, Bacteria, and Viruses in Marine Samples. John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 11.11.11–15.
- Medler, S., Silverman, H., 2001. Muscular alteration of gill geometry in vitro: implications for bivalve pumping processes. *Biol. Bull.* 200, 77–86.
- Nagai, K., Honjo, T., Go, J., Yamashita, H., Oh, S.J., 2006. Detecting the shellfish killer *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) by measuring bivalve valve activity with a Hall element sensor. *Aquaculture* 255, 395–401.
- Narahashi, T., Moore, J.W., 1968. Neuroactive agents and nerve membrane conductances. *J. Gen. Physiol.* 51, 93–101.
- Navarro, J.M., Contreras, A.M., Chaparro, O.R., 2008. Short-term feeding response of the mussel *Mytilus chilensis* exposed to diets containing the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 81, 41–49.
- Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M., Yasumoto, T., 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Graneli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier Science Publishing, New York, pp. 391–396.
- Oshima, Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 78, 528–532.
- Schmitt, F.G., De Rosa, M., Durrieu, G., Sow, M., Tran, D., P., Ciret, P., Massabuau, J.C., 2011. Statistical study of bivalve high frequency microclosing behavior: scaling properties and shot noise analysis. *Int. J. Bifurcat. Chaos* (in press).
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.C., 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 914–920.
- Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P., Massabuau, J.C., 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture* 298, 338–345.
- Tran, D., Nadau, A., Durrieu, G., Ciret, P., Parisot, J.P., Massabuau, J.C., 2011. Field chronobiology in a molluscan bivalve: how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiol. Int.* (in press).
- Wildish, D., Lassus, P., Martin, J., Saulnier, A., Bardouil, M., 1998. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp., on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 11, 35–43.



## 2.4. Synthèse

L'étude décrite dans le premier de ces deux articles avait pour but de déterminer si le comportement de l'huître, *C. gigas*, pouvait être modifié par la présence d'*A. minutum*. Pour ce faire, un valvomètre a été utilisé afin d'enregistrer l'activité valvaire des huîtres lors d'expositions à la micro-algue toxique. Cette première étape a permis de mettre en évidence une modification globale du comportement des huîtres en présence d'*A. minutum*. Cette modification de comportement s'est caractérisée par une augmentation du temps d'ouverture et de la fréquence des fermetures incomplètes (micro-fermetures) des valves, ainsi qu'une diminution de l'amplitude d'ouverture.

Lors d'une seconde étape exposée dans le deuxième article, nous avons cherché à déterminer s'il existait un lien entre la modification du comportement des huîtres, la concentration en micro-algues toxiques dans l'eau et la quantité de toxines accumulées au niveau individuel. L'activité valvaire de *C. gigas* en présence d'*A. minutum* a donc été enregistrée et les quantités de PSTs accumulées au niveau de la glande digestive de chaque huître ont été mesurées à la fin de l'exposition. Cela nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un lien entre le temps d'ouverture des huîtres et la quantité de toxines accumulées : plus les huîtres sont ouvertes longtemps, plus elles accumulent de toxines. Cette étude nous a également permis de suggérer un lien entre la sensibilité des huîtres vis-à-vis des PSTs, la modification du comportement et la quantité de toxines accumulées : plus les huîtres sont sensibles aux PSTs, moins elles restent ouvertes longtemps et de façon importante (amplitude) en présence d'*A. minutum* et moins elles accumulent de toxines. Une telle différence de sensibilité aux PSTs a été mise en évidence par Bricelj et Shumway (1998) entre différentes espèces de bivalves. Cette constatation est aussi vraie pour des individus appartenant à une même espèce, mais provenant de sites différents (Bricelj et al., 2005). Ces deux études soulignent également que moins les bivalves sont sensibles aux PSTs, plus ils accumulent de toxines (et inversement). De plus, cette seconde étude nous a permis de démontrer l'existence d'un lien entre la fréquence des micro-fermetures et la concentration en *A. minutum* : plus la concentration en micro-algues toxiques est élevée, plus la fréquence des micro-fermetures augmente.

Cette seconde étude souligne aussi l'existence, chez *C. gigas*, d'une variabilité inter-individuelle du comportement en présence du dinoflagellé toxique, *A. minutum*.

Pour aller plus loin dans cette démarche intégrative, il nous est apparu important de déterminer quels pouvaient être les impacts internes induits par l'exposition des huîtres à *A. minutum*. Plusieurs paramètres physiologiques des huîtres ont donc été pris en compte dans certains organes (muscle, branchies, glande digestive), tissus (hémolymphes) et cellules (spermatozoïdes).





## 3. Impacts d'*A. minutum* sur la physiologie de *C. gigas*

### 3.1. Introduction

L'exposition de bivalves à des micro-algues toxiques entraîne une accumulation de phycotoxines dans leurs tissus. Ces toxines sont susceptibles d'induire des modifications physiologiques au niveau des organes, des tissus et des cellules des organismes contaminés.

Dans le cadre de l'étude présentée ici, nous avons choisi, dans un premier temps, de déterminer si l'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* pouvait provoquer des changements physiologiques. Afin d'obtenir plusieurs stades de maturité simultanément, nous avons choisi d'utiliser des huîtres triploïdes qui présentent une gamétogenèse moins active que les diploïdes. Des huîtres diploïdes et triploïdes ont donc été exposées à la micro-algue toxique durant la période de maturation gonadique afin d'évaluer quel pouvait être le lien entre le stade de maturité des huîtres et les modifications physiologiques induites par *A. minutum*. Plusieurs paramètres physiologiques ont été évalués chez les huîtres exposées et ils ont été comparés à ceux d'huîtres témoins. Les paramètres sélectionnés étaient : le stade de maturité, le contenu en PSTs de la glande digestive ainsi que son contenu en protéines, l'activité de l'amylase et les quantités de lipides de réserve, mais aussi différents paramètres hématocytaires et humoraux.

Dans un second temps, afin de compléter et d'approfondir les résultats obtenus lors de la première série d'expérimentations, des huîtres diploïdes ont à nouveau été exposées à *A. minutum*. Des paramètres physiologiques supplémentaires sont venus s'ajouter à ceux évalués lors la première étape de l'étude. Ainsi, les contenus en lipides structuraux de la glande digestive ont été quantifiés, afin d'observer une éventuelle modification de la structure de cet organe. Des observations histologiques ont également été réalisées aux niveaux de différents organes et tissus, pour détecter la présence de pathologies. Enfin, l'état physiologique des spermatozoïdes produits par les huîtres exposées a été évalué, afin de mettre en évidence un impact potentiel de *A. minutum* sur la qualité des gamètes.



### 3.2. Article 4 – Effects of *Alexandrium minutum* exposure on physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*.

Aquatic Toxicology 97 (2010) 96–108



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquatox](http://www.elsevier.com/locate/aquatox)



#### Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*

Hansy Haberkorn<sup>a</sup>, Christophe Lambert<sup>a</sup>, Nelly Le Goïc<sup>a</sup>, Marielle Guéguen<sup>b</sup>, Jeanne Moal<sup>c</sup>, Elena Palacios<sup>d</sup>, Patrick Lassus<sup>b</sup>, Philippe Soudant<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Plac Copernic,

Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

<sup>b</sup> IFREMER Centre de Nantes, Laboratoire Phycotoxines, BP 21105, 44311 Nantes, France

<sup>c</sup> IFREMER Centre de Brest, Laboratoire de Physiologie des Mollusques, BP 70, 29280 Plouzané, France

<sup>d</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S., Mexico

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 14 May 2009

Received in revised form 1 December 2009

Accepted 4 December 2009

##### Keywords:

Oysters

Ploidy

Physiology

Harmful-algal bloom

*Alexandrium minutum*

PST accumulation

#### ABSTRACT

The effects of an artificial bloom of the toxin-producing dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, upon physiological parameters of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, were assessed. Diploid and triploid oysters were exposed to cultured *A. minutum* and compared to control diploid and triploid oysters fed *T. Isochrysis*. Experiments were repeated twice, in April and mid-May 2007, to investigate effects of maturation stage on oyster responses to *A. minutum* exposure. Oyster maturation stage, Paralytic Shellfish Toxin (PST) accumulation, as well as several digestive gland and hematological variables, were assessed at the ends of the exposures.

In both experiments, triploid oysters accumulated more PSTs (approximately twice) than diploid oysters. Significant differences, in terms of phenoloxidase activity (PO) and reactive oxygen species (ROS) production of hemocytes, were observed between *A. minutum*-exposed and non-exposed oysters. PO in hemocytes was lower in oysters exposed to *A. minutum* than in control oysters in an early maturation stage (diploids and triploids in April experiment and triploids in May experiment), but this contrast was reversed in ripe oysters (diploids in May experiment). In the April experiment, granulocytes of oysters exposed to *A. minutum* produced more ROS than those of control oysters; however, in the May experiment, ROS production of granulocytes was lower in *A. minutum*-exposed oysters. Moreover, significant decreases in free fatty acid, monoacylglycerol, and diacylglycerol contents in digestive glands of oysters exposed to *A. minutum* were observed. Concurrently, the ratio of reserve lipids (triacylglycerol, ether glycerides and sterol esters) to structural lipids (sterols) decreased upon *A. minutum* exposure in both experiments. Also, several physiological responses to *A. minutum* exposure appeared to be modulated by maturation stage as well as ploidy of the oysters.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Among harmful algae, *Alexandrium* species are known to produce Paralytic Shellfish Toxins (PSTs), the most widespread shellfish-contaminating biotoxins, with outbreaks occurring worldwide (Huss, 2003). In France, *Alexandrium minutum* Halim (1960) has been known to bloom in coastal waters since the 1980s (Lassus et al., 1992), especially in North Brittany (English Channel) during summer (Morin et al., 2000).

PSTs are comprised of approximately 20 naturally occurring biotoxin derivatives that vary widely in specific toxicity (measured

by standard mouse bioassay, MBA). The basic molecular structure is that of saxitoxin (STX). PSTs are neurotoxins, the mode of action of which involves a reversible and highly specific block of sodium channel transport, disabling the action potential of excitable membranes (nerves and muscle fibers) (Narahashi, 1988).

The current EU regulatory limit for human consumption of shellfish is set at 80 µg STX eq. 100 g<sup>-1</sup> shellfish meat (SM). Considering, however, possible consumption of a large portion (400 g) of shellfish, the European Food Safety Authority (EFSA) recently established that the maximum concentration in shellfish meat should be less than 7.5 µg STX eq. 100 g<sup>-1</sup> SM to avoid exceeding the acute reference dose (ARfD) of 0.5 µg STX eq. kg<sup>-1</sup> body weight (EFSA Journal, 2009). It is also estimated that 25% of EU samples compliant with the EU limit exceeded the concentration set by ARfD (EFSA Journal, 2009). The mouse bioassay (AOAC, 1990) protocol is the

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 49 86 23; fax: +33 2 98 49 86 45.  
E-mail address: [Philippe.Soudant@univ-brest.fr](mailto:Philippe.Soudant@univ-brest.fr) (P. Soudant).

officially prescribed method for the evaluation of STX-group toxin contamination. Although MBA sensitivity ( $37 \mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$ ) allows quantification of STX-group toxins at the current EU regulatory limit, it is not within the range of ARfD concentrations (EFSA Journal, 2009). Only the HPLC-fluorescence detection method has sensitivity sufficient to quantify STX-group toxins at  $1\text{--}8 \mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$  SM.

Several commercially harvested bivalve species, such as oysters, are known to accumulate PSTs by feeding on PST-producing phytoplankton (see review by Bricelj and Shumway, 1998). Bivalves show significant (up to 100-fold) inter-specific differences in accumulation of PSTs, which is inversely correlated with toxin sensitivity (Bricelj and Shumway, 1998). This variability in sensitivity to PSTs appears to be related to nerve sensitivity in a dose-dependent manner. Indeed, Bricelj and Shumway (1998) reported that  $10^{-7} \text{ g ml}^{-1}$  STX was sufficient to block the action potential of nerves in eastern oysters *Crassostrea virginica* when  $10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$  was insufficient to block action potential in blue mussels (*Mytilus edulis*). Some bivalve species possessing nerves insensitive to PST (*M. edulis*) readily feed on toxic cells and thereby accumulate high toxin levels. In contrast, species such as *C. virginica* are highly sensitive to PSTs, accumulating less toxins and exhibiting physiological and behavioral mechanisms to avoid or reduce exposure to toxic cells (Bricelj and Shumway, 1998). The Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the soft-shell clam *Mya arenaria* (two PST-sensitive species) were reported to reduce filtration activity when feeding on PST-containing microalgae (Lassus et al., 2004; Bricelj and Shumway, 1998). Differences in toxin accumulation (up to five times) were also observed between different populations of the same species, *M. arenaria*, and this difference was surmised to be related to nerve sensitivity differences (Bricelj et al., 2005). Indeed, a natural mutation of a single amino acid residue decreasing affinity (1000-fold) of the saxitoxin-binding site in the sodium channel pore, was found to be responsible for the difference in nerve sensitivity between two populations of *M. arenaria* exposed to PST-producing *Alexandrium fundyense* (Bricelj et al., 2005).

Toxin composition and content in toxigenic microalgae vary greatly according to species or strain and depend also on environmental or culture conditions (Hégaret et al., 2009). An *A. minutum* strain isolated in France was found to produce  $1.5 \text{ pg STX eq. cell}^{-1}$  (Lassus et al., 2004), whereas the same species isolated in New Zealand produced  $11 \text{ pg STX eq. cell}^{-1}$  (Chang et al., 1997). Chou et al. (2004) reported that toxin content of different clones of *A. minutum* isolated in Taiwan varied from 11 to  $103 \text{ pg STX eq. cell}^{-1}$ . This variability in algal toxin content has consequences to feeding responses to and toxin accumulation of bivalves exposed to *Alexandrium* species. Bardouil et al. (1993) observed that the clearance rate in *C. gigas* decreased more drastically when oysters were exposed to *Alexandrium tamarense* ( $7.2 \text{ pg STX eq. cell}^{-1}$ ) than to *A. minutum* ( $0.5 \text{ pg STX eq. cell}^{-1}$ ). When exposed to less-toxic *Alexandrium* species or strains, sensitive bivalves such as *C. gigas* can feed on and accumulate PSTs (Lassus, unpubl. obs.).

*Alexandrium* species are also known to produce other toxic compounds, such as ichthyotoxins (Emura et al., 2004) and allelochemicals (Arzul et al., 1999; Tillmann et al., 2008). Ford et al. (2008) tested effects of two *A. tamarense* strains, PST and non-PST producing, upon Manila clam *Ruditapes philippinarum* and *M. arenaria* hemocytes. This study showed that the non-PST strain had more negative impacts on hemocytes (decreased adhesion and phagocytosis) compared to the PST-producing strain of *A. tamarense* (Ford et al., 2008).

Aside from toxin accumulation and associated human health issues, there is some concern about the impact of *A. minutum* exposure on the physiology and health of *C. gigas*. Furthermore, the physiological status of animals may also feed-back to rates of toxin accumulation and effects during HAB exposure.

Li et al. (2002) studied the effect of *A. tamarense* (PST-containing strain) on bio-energetics and growth rate of the clam *R. philippinarum* and the mussel *Perna viridis*. High concentrations of toxic *A. tamarense* (resulting in high PST burdens in the tissues) decreased clearance rate of the clam but not of the mussel. Absorption efficiency, however, decreased for both species with diets containing PST, which resulted in a reduction in energy budget. HABs occurring during specific stages of reproduction could be another major factor affecting oysters, in terms of energy budget. In *C. gigas*, energy balance (evaluated through scope for growth methods) has been demonstrated to decrease as gametogenesis progresses, resulting in a negative scope for growth (Lambert et al., 2008). The digestive gland plays an obvious, major role in nutrient digestion and assimilation, as digestive enzyme activities in bivalves can be affected by nutritional condition. Indeed, changes in enzymatic activities are mechanisms used by bivalves to optimize energy gain when experiencing variation in dietary input (Fernández-Reiriz et al., 2001; Labarta et al., 2002). The mussel *Mytilus chilensis* can, indeed, use toxic microalgae (*Alexandrium catenella*) as a food source by adjusting carbohydrase activities (amylase, laminarinase and cellulase) and absorption mechanisms (Fernández-Reiriz et al., 2008). It is, thus, pertinent to assess digestive enzyme activities in bivalves exposed to toxic microalgae. Moreover, the digestive gland is also involved in energy storage, preferentially as lipids (Soudant et al., 1999). As HABs are likely to impact digestive gland structure and functions, it appears prudent to assess how HABs could modulate quantities of individual lipid classes involved in energy storage in this organ. Moreover, the digestive gland is the organ accumulating the most toxins compared to other tissues in bivalves (Bricelj and Shumway, 1998).

In bivalves, one line of defense to noxious, harmful or pathogenic agents resides in circulating cells called hemocytes that are similar to white blood cells in vertebrates (Cheng, 1996). Concerning hemocyte variables, Hégaret et al. (2007a,b, 2008) reported that harmful-algal exposure can modulate cellular immune components and functions of bivalves. Moreover, Galimany et al. (2008) observed an inflammatory response in the stomach of *M. edulis* exposed to *A. fundyense*. These findings indicate that the bivalve immune system can be activated by certain harmful algae, or conversely can be suppressed. The reproductive period is also associated with changes in hemocyte variables; some are depressed in *C. gigas* during gametogenesis, specifically hemocyte concentration, phagocytosis, and adhesion (Lambert et al., 2008). During gametogenesis, hemocytes in triploid oysters were found to have higher phagocytic, esterase and peroxidase activities than those of diploids (Gagnaire et al., 2006). These differences were attributed to the reduced gametogenic development of the triploids.

Indeed, triploid oysters are increasingly used for aquaculture because they can be marketed during summer when diploid oysters are fully ripe and not appreciated by consumers. It is unknown, however, how triploidy may affect toxin accumulation.

The purpose of the present study was to determine the effects of an artificial bloom of the toxin-producing dinoflagellate, *A. minutum* (strain AM89BM), upon digestive parameters, and hemocyte and plasma variables of the Pacific oyster, *C. gigas*. Diploid and triploid oysters were compared to assess any differences in toxin accumulation and physiological responses to harmful-algal exposure. Experiments were conducted at two different periods (1 month apart), using the same oyster stock, to obtain a gradient of gonad maturation. After 4 days of exposure to *A. minutum* or *Isochrysis* sp. (clone Tahitian T. Iso) as a non-toxic control, toxin accumulation, reserve lipid classes and amylase activities, plasma phenoloxidase activity, hemolysate/agglutination capacity, and hemocyte concentration, morphology, viability, phagocytosis activity, reactive oxygen species production and phenol-oxidase activity, were measured.



## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological material

#### 2.1.1. Oysters

Diploid and triploid Pacific oysters, *C. gigas*, used in the two experiments were obtained from an oyster producer at Île de Kerner (Morbihan, France) and belong to the same commercial stocks (20–21 months old). For each experiment, we used 60 diploid and 60 triploid oysters. In April, flesh dry weight was  $1.22 \pm 0.12$  and  $0.90 \pm 0.09$  g in diploids and triploids, respectively. In May, flesh dry weight was  $1.33 \pm 0.14$  and  $0.98 \pm 0.09$  g in diploids and triploids, respectively. At both collection times, three pools of four oysters (for each ploidy) were confirmed to be free of PST contamination (no detectable levels of PSTs by IP-HPLC analysis).

#### 2.1.2. Algal culture

*A. minutum* (strain AM89BM) was grown in 10-l batch culture using autoclaved seawater filtered to  $1 \mu\text{m}$  and supplemented with L1 medium (Guillard and Hargraves, 1993). Cultures were maintained at  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $100 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , with a dark:light cycle of 12:12 h. *A. minutum* was harvested after 12 days, still in exponential growth phase under our conditions. At this age, this strain produced  $1.3 \pm 0.1$  pg STX eq. cell $^{-1}$  (measured by the method of Oshima, 1995).

*Isochrysis* sp., clone Tahitian (*T. Iso*), cultures were obtained from the Argenton hatchery (IFREMER, France). Cultures were produced in 300-l cylinders containing  $1 \mu\text{m}$  filtered seawater enriched with Conway medium at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , air-CO $_2$  (3%) mix aerated, and with continuous light. *T. Iso* was harvested in the exponential growth phase (6–8 days) for the feeding experiments.

### 2.2. Experimental design of *A. minutum* exposures

For each experiment (April and May), 120 oysters (60 diploids and 60 triploids) were placed randomly in twelve 15-l tanks (10 oysters per tank). Oysters were acclimated for 10 days with continuous flow of  $14 \text{ ml min}^{-1}$  of seawater (filtered to  $0.5 \mu\text{m}$ ) with *T. Iso*,  $5 \times 10^5$  cells ml $^{-1}$  at  $16 \pm 1^\circ\text{C}$ . After acclimation, diploid and triploid oysters were fed continuously for 4 days  $14 \text{ ml min}^{-1}$  with  $5 \times 10^5$  cells ml $^{-1}$  of *T. Iso* (6 control tanks with diploids and triploids) and with  $5 \times 10^3$  cells ml $^{-1}$  of *A. minutum* (equivalent to 6.5 ng STX eq. (6 treatment tanks with diploids and triploids).

### 2.3. Oyster sampling

At the end of the algal exposure, all oysters were sampled and distributed as follows. For each tank (10 oysters), gonads of two oysters were used for histological analysis of maturation stage. Pooled digestive glands of four oysters were used to measure toxins, reserve lipid contents, and amylase activity. Four oysters were used for individual plasma and hemocyte variable measurements and condition index.

### 2.4. Qualitative analysis of maturation stages

Gonads were dissected and transferred into Bouin fixative (for 48 h). Fixed gonads were dehydrated in ascending ethanol solutions, cleared with xylene and embedded in paraffin wax. Five-micrometer thick sections were cut, mounted on glass slides, and stained with Harry's hematoxylin–eosin Y (Martoja et al., 1967). Slides were examined under a light microscope to determine gametogenic stage according to the reproductive scale reported by Mann (1979). In this scale, four stages are defined: stage 0 (inactive), stage

1 (early gametogenesis), stage 2 (late gametogenesis) and stage 3 (ripe).

### 2.5. Condition index

To assess the dry weight of oyster-flesh, soft tissues were removed from shells and placed in a pre-weighed aluminum cup. Shell and flesh were dried for 48 h at  $70^\circ\text{C}$  and then weighed. Condition index of individual oysters was then calculated as described previously (Lucas and Beninger, 1985), following the formula: (g dry flesh weight/g dry shell weight)  $\times 100$ .

### 2.6. Digestive gland variables

Just after dissection, digestive glands were immediately frozen in liquid nitrogen, weighed, pooled (1 pool of 4 digestive glands per tank), and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Later on, pools were ground with a “Dangoumeau” homogenizer into liquid nitrogen and divided for three different analyses.

#### 2.6.1. Toxin content

One gram of ground digestive gland was extracted in 2 ml of 0.1N HCl (2, v/w) at  $4^\circ\text{C}$ . After centrifugation ( $3000 \times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ), the pH of extracts was adjusted. If above 3.0, pH was adjusted to 3.0 with 12N HCl. After half-dilution, supernatants were ultra-filtered (20 kDa, Sartorius Centrisart) and stored at  $4^\circ\text{C}$  until analysis. PSTs were analyzed by ion-pairing, high-performance liquid chromatography (IP-HPLC) according to the method of Oshima (1995). The molar concentration ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) was converted into  $\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$  of digestive gland by using the conversion factors of Oshima (1995). Results were expressed in  $\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$  of digestive gland wet weight.

#### 2.6.2. Reserve lipid content

Ground digestive gland (250 mg) was extracted in 6 ml of Folch solution (chloroform:methanol, 2:1). Lipid classes were analyzed by high-performance, thin-layer chromatography (HPTLC) on HPTLC glass plates ( $20 \times 10 \text{ mm}$ ) pre-coated with silica gel 60 from Merck (Darmstadt, Germany). A preliminary run was carried out to remove possible impurities using hexane:diethyl ether (1:1), and the plate was activated for 30 min at  $110^\circ\text{C}$ . Lipid samples (4  $\mu\text{l}$ ) were spotted on the plates by the CAMAG automatic sampler. The neutral lipids were separated using a double development with hexane:diethyl ether:acetic acid (20:5:0.5) as first solvent system followed with hexane:diethyl ether (93:3) as a second solvent system. Lipid classes appeared as black bands after dipping plates in a cupric sulfate, phosphoric acid solution and heating for 20 min at  $160^\circ\text{C}$  (charring). Seven neutral lipid classes (categorized as storage lipids: free fatty acids, sterol esters, glyceride ethers, monoacylglycerol, diacylglycerol and triacylglycerol; considered as structural lipids: sterols) were identified based upon standard (Sigma–Aldrich, France) and coloring techniques. The charred plates were read by scanning at 370 nm, and black bands were quantified by Wincats software. Results were expressed as mg of each identified neutral lipid class per g of digestive gland wet weight.

#### 2.6.3. Amylase activity

Ground digestive gland (200 mg) was homogenized in 1 ml of distilled water and 200  $\mu\text{l}$  of this solution were added to 10  $\mu\text{l}$  of 0.5M CaCl $_2$  solution before analysis to assess amylase activity. Amylase activity was then assayed by determination of starch hydrolysis according to the iodine reaction (Samain et al., 1977) modified by Le Moine et al. (1997). One unit of alpha-amylase was defined as the amount of enzyme that degrades  $1 \text{ mg min}^{-1}$  starch at  $45^\circ\text{C}$ .

To assess specific activities, total proteins were determined using the BCA Protein Assay (Biorad). For protein extraction, 200  $\mu$ l of the above solution were added to 200  $\mu$ l of 2N NaOH solution. Protein analysis was carried out on 10  $\mu$ l of 1/10 diluted samples according to the manufacturer's description. Briefly, 200  $\mu$ l of dye reagent was added to 10  $\mu$ l of sample, incubated at 37 °C for 1 h and the absorbance was measured at 595 nm. Sample ODs were compared to a standard curve of Bovine Serum Albumin (BSA), and results were expressed as mg of protein ml<sup>-1</sup>. Amylase activity was expressed as UI of amylase activity per mg of total protein (specific activity).

## 2.7. Hemolymph variables

### 2.7.1. Hemolymph sampling

Hemolymph was withdrawn from individual oysters using a 1 ml plastic syringe fitted with a 25-gauge needle inserted through a notch made adjacent to the adductor muscle just prior to bleeding. All hemolymph samples were examined microscopically for contamination (e.g., gametes, tissue debris) and then stored in micro-tubes held on ice. As recommended by flow cytometer (FCM) manufacturer, all samples were filtered through 80  $\mu$ m mesh prior to analysis to eliminate any large debris (>80  $\mu$ m) which could potentially clog the flow cytometer. Three hundred microliters (3 measures  $\times$  100  $\mu$ l) of each hemolymph sample were used to measure hemocyte variables by flow cytometry. The remaining hemolymph was separated into cellular (hemocytes) and supernatant (plasma) fractions by centrifugation (800  $\times$  g, 5 min, 4 °C) prior to freezing (-20 °C). These samples then were used to measure biochemical hemocyte and plasma variables (protein content, phenol-oxidase activity and hemolysis/agglutination titers). Methods for measuring cellular (hemocyte) and humoral (plasma) variables are described hereafter.

### 2.7.2. Measurements of hemocyte variables by flow cytometry

Characterization of hemocyte sub-populations, number and functions were performed using a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometer (FCM) equipped with a 488 nm argon laser. Two kinds of hemocyte variables were evaluated by FCM: descriptive variables (hemocyte viability and total and hemocyte sub-population counts), and functional variables (phagocytosis and reactive oxygen species (ROS) production). Analyses were done as described below.

**2.7.2.1. Descriptive variables. Hemocyte viability, total and hemocyte sub-population counts:** These variables were measured individually on hemolymph samples (4 individuals per tank). An aliquot of 100  $\mu$ l of hemolymph from an individual oyster was transferred into a tube containing a mixture of Anti-Aggregant Solution for Hemocytes, AASH (Auffret and Oubella, 1995) and filtered sterile seawater (FSSW), 200 and 100  $\mu$ l, respectively. Hemocyte DNA was stained with two fluorescent DNA/RNA specific dyes, SYBR Green I (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA, 1/1000 of the DMSO commercial solution), and propidium iodide (PI, Sigma, St Quentin Fallavier, France, final concentration of 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) in the dark at 18 °C for 120 min before flow cytometric analysis. PI permeates only hemocytes that lose membrane integrity and are considered to be dead cells, whereas SYBR Green I permeates both dead and live cells. SYBR Green and PI fluorescence were measured at 500–530 nm (green) and at 550–600 nm (red) wavelengths, respectively, by flow cytometry. Thus, by counting the cells stained by PI and cells stained by SYBR Green, it was possible to estimate the percentage of viable cells in each sample. All SYBR Green-stained cells were visualized on a Forward Scatter (FSC, size) and Side Scatter (SSC, cell complexity) cytogram. Three sub-populations were distinguished according to size and cell complexity (granularity). Granulocytes are charac-

terized by high FSC and high SSC, hyalinocytes by high FSC and low SSC, while agranulocytes have low FSC and SSC. Total hemocyte, granulocyte, hyalinocyte, and agranulocyte concentrations estimated from the flow-rate measurement of the flow cytometer (Marie et al., 1999) as all samples were run for 30 s. Results were expressed as number of cells per milliliter of hemolymph.

**2.7.2.2. Functional variables.** These variables were measured individually on hemolymph samples, for each condition.

**Phagocytosis:** An aliquot of 100  $\mu$ l hemolymph, diluted with 100  $\mu$ l of FSSW, was mixed with 30  $\mu$ l of YG, 2.0- $\mu$ m fluoresbrite microspheres, diluted to 2% in FSSW (Polysciences, Eppelheim, Germany). After 120 min of incubation at 18 °C, hemocytes were analyzed at 500–530 nm by flow cytometry to detect hemocytes containing fluorescent beads. The percentage of phagocytic cells was defined as the percentage of hemocytes that had engulfed three or more beads (Delaporte et al., 2003).

**Reactive oxygen species production:** Reactive oxygen species (ROS) production by untreated hemocytes was measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA (Lambert et al., 2003). A 100- $\mu$ l aliquot of pooled hemolymph was diluted with 300  $\mu$ l of FSSW. Four  $\mu$ l of the DCFH-DA solution (final concentration of 0.01 mM) was added to each tube maintained on ice. Tubes were then incubated at 18 °C for 120 min. After the incubation period, DCF fluorescence, quantitatively related to the ROS production of untreated hemocytes, was measured at 500–530 nm by flow cytometry. Results are expressed as the geometric mean fluorescence (in arbitrary units, AU) detected in each hemocyte sub-population.

### 2.7.3. Biochemical hemocyte and plasma variables

**2.7.3.1. Hemocyte and plasma phenoloxidase activities.** Plasma samples were thawed on ice, and 100  $\mu$ l of each was transferred to 96-well plates. For hemocytes, cells were suspended in 100  $\mu$ l of FSSW and frozen and thawed on ice three times successively. Phenoloxidase activity was measured as described by Reid et al. (2003). Briefly, 50  $\mu$ l of Tris-HCl buffer (0.2 M, pH = 8) and 100  $\mu$ l of L-DOPA (20 mM, L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine, Sigma D9628) were added to each well. The microplate was rapidly mixed for 10 s. The reaction was then measured at ambient temperature, with color change recorded every 5 min, at 492 nm, over a period of 1 h. The microplate was mixed prior to each measurement. Two controls, without sample but containing L-DOPA and Tris-SDS buffer, were measured in parallel, and these values were subtracted from test values to correct for possible auto-oxidation of the L-DOPA.

To assess specific activity of phenol oxidase, protein analysis was carried out as described for digestive glands (see Section 2.6.3), except that proteins were not extracted with NaOH and samples were not diluted. Results were expressed as specific activity of phenol oxidase.

**2.7.3.2. Agglutination and hemolysis titers in plasma.** Agglutination titer (indicative of the presence of lectins) and hemolysis titer (indicative of red blood cell lysis factors) were measured on a sub-sample of plasma (supernatant) fraction. Quantification of agglutination titer was performed according to the protocol from Barracco et al. (1999), using horse red blood cells. Briefly, 50- $\mu$ l plasma samples were added to U-shaped wells of 96-well-microtiter plates, and a twofold, serial dilution (pure solution to 1/2 dilution) was prepared using Tris-buffered saline (containing 0.15 M NaCl). The same volume of a 2% suspension of horse red blood cells in TBS was added to each well and incubated for 3 h at room temperature. In controls, oyster plasma was replaced with TBS. Agglutination titer and hemolysis titer were expressed as the log (base 2) of the reciprocal of the highest dilution showing a



positive pattern of agglutination or hemolysis of red cells, respectively.

### 2.8. Statistical analysis

Differences between experiments (April and May) were assessed using Student's *t*-test. Results of each experiment were analyzed statistically using Multifactor-ANOVA (MANOVA) for each physiological parameter and hemocyte variable as the dependent variable, and feeding treatment and ploidy as independent variables. Before mean comparison, percentages were transformed to arcsin(squareroot(X)). Whenever a clear trend appeared on the graphs, a Student's *t*-test was also used within ploidy groups to assess differences linked to dietary treatment for a dependent variable. We used Statgraphics Plus statistical software (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA). Results were considered significant when the *p*-value was <0.05.

## 3. Results

### 3.1. Gonad maturation stages

Oysters fed *T. Iso* and *A. minutum* were combined to assess oyster gonad maturation (Fig. 1). Maturation of both diploid and triploid oysters was more advanced during the May experiment than during April. In both experiments, triploids were less mature than diploids. Oyster groups in both experiments can be classified according to gonad maturation stage (from less mature to more mature) first were triploids in April, triploids in May, then diploids in April, and at last diploids in May.

Triploids in the April experiment were mostly at the undifferentiated stage, and one third were in early and late gametogenesis;

triploids in the May experiment were in early and late gametogenesis, diploids in the April experiment were dominated by late gametogenesis with 20% mature oysters; and finally, diploids in the May experiment were mainly (60%) observed to be sexually mature while 40% were in late gametogenesis.

### 3.2. Wet weight of digestive gland and condition index

There was no significant difference, in term of condition index (CI), attributable to diet or ploidy in both experiments (Table 1). Whole-oyster dry weight (DW) was significantly higher in diploid oysters than in triploid oysters for both experiments (in April  $p=0.0045$  and in May  $p=0.0021$ , MANOVA). DW of both diploid and triploid oysters did not change significantly between the two experiments. Wet weights (WW) of digestive glands were similar in the April experiment regardless of diet or ploidy. In the May experiment, mean WW of digestive gland was significantly higher in diploids than in triploids. Exposure to *A. minutum* in this experiment resulted in a significant decrease in digestive gland WW compared to *T. Iso* feeding. A significant interaction between ploidy and diet was also noted; lower digestive gland WW was found in triploid oysters exposed to *A. minutum*.

### 3.3. Toxin content

PST content in digestive gland was significantly higher in May than in April ( $p=0.003$ , *t*-test). In both experiments, triploid oysters accumulated more toxin – about twice – than diploids (Fig. 2); April experiment  $p=0.032$  and May experiment  $p=0.047$ , *t*-test. Concomitantly, *A. minutum* cells were observed in digestive gland and bio-depots.

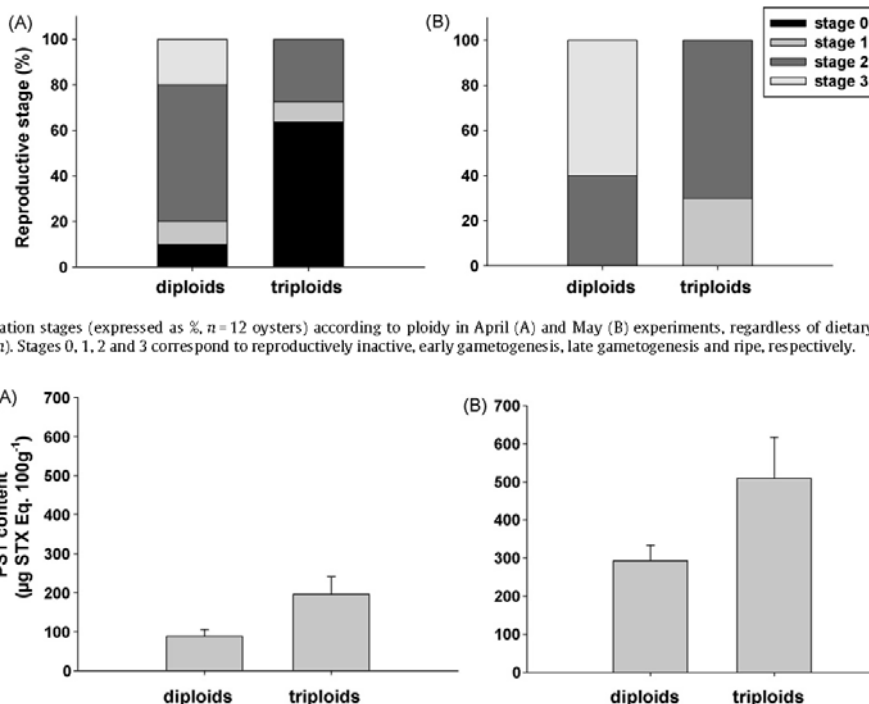


Fig. 1. Oyster maturation stages (expressed as %,  $n = 12$  oysters) according to ploidy in April (A) and May (B) experiments, regardless of dietary conditioning (*T. Iso* or *Alexandrium minutum*). Stages 0, 1, 2 and 3 correspond to reproductively inactive, early gametogenesis, late gametogenesis and ripe, respectively.

Fig. 2. PST content (mean of 3 pools of 4 oysters each, as  $\mu\text{g STX equiv. } 100\text{g}^{-1}$  of tissue wet weight,  $\pm\text{CI}$ ) in digestive gland of diploid and triploid oysters exposed to *A. minutum* in April (A) and May (B) experiments.



**Table 1**  
Oyster condition index, body dry weight and digestive gland wet weight according to ploidy and microalgal exposure. This table also includes the results of the MANOVAs testing ploidy and microalgal exposure effects separately in both experiments.

	April experiment				May experiment			
	Mean ± CI		MANOVA		Mean ± CI		MANOVA	
	Diploids		P	D	Diploids		P	D
	<i>A. minutum</i>	T. Iso			<i>A. minutum</i>	T. Iso		
Condition index	4.3 ± 0.3	4.6 ± 0.3	NS	NS	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.2	NS	NS
Body dry weight (in g)	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.09	NS	NS	1.2 ± 0.07	1.2 ± 0.07	NS	NS
Digestive gland wet weight (in g)	0.7 ± 0.04	0.7 ± 0.06	NS	NS	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.03	NS	NS
Triploids								
<i>A. minutum</i>								
T. Iso								
Triploids								
<i>A. minutum</i>								
T. Iso								
Triploids								
<i>A. minutum</i>								
T. Iso								

P = ploidy; D = diet; P/D, interaction ploidy and diet; NS, non-significant.

\* Significant difference is indicated by  $p < 0.05$ .

\*\* Significant difference is indicated by  $p < 0.01$ .

\*\*\* Significant difference is indicated by  $p < 0.001$ .

### 3.4. Digestive gland parameters

#### 3.4.1. Reserve lipid content

Neutral lipid classes detected in digestive glands were free fatty acids, sterol esters, ether glycerides, sterols, monoacylglycerols, diacylglycerols and triacylglycerols (Table 2). A reserve/structure ratio was determined as the ratio between reserve lipids (sterol ester + glycerid ether + triacylglycerol content) and a structural lipid (sterol content).

In both experiments, monoacylglycerol, diacylglycerol and free fatty acid contents (Fig. 3) were significantly lower in both diploid and triploid oysters fed *A. minutum* as compared to those fed T. Iso (Table 2). In May, contents of sterols, triacylglycerols, and sterol esters, as well as the reserve/structure ratio, were higher in diploids than in triploids.

In April, the reserve/structure ratio was significantly lower (Fig. 4) in triploid oysters exposed to *A. minutum* as compared to triploids fed T. Iso ( $p = 0.0427$ ,  $t$ -test). Exposure to *A. minutum* similarly resulted in a significant decrease of this ratio in diploids in May ( $p = 0.0067$ ,  $t$ -test).

#### 3.4.2. Specific activity of amylase

Specific activity of amylase (ASA) was significantly higher in May than in April ( $p = 0.0222$ ,  $t$ -test) (Fig. 5). In both experiments ASA was higher in triploids than in diploids (April experiment  $p = 0.0263$ ; May experiment  $p = 0.0134$ , MANOVA). ASA was higher in *A. minutum*-exposed than in control, diploid oysters in April ( $p = 0.0467$ ,  $t$ -test), but was similar in exposed and non-exposed triploid oysters. In May, only triploid oysters showed a significant increase of ASA upon *A. minutum* exposure ( $p = 0.0337$ ,  $t$ -test).

### 3.5. Hemocyte and plasma variables

Overall, ploidy had more significant impacts on hemocyte and plasma variables than algal exposure (Table 3).

#### 3.5.1. Hemocyte characteristics and functions analyzed by flow cytometry

Total hemocyte count (THC) was significantly higher in May than in April. THC increased significantly upon *A. minutum* exposure in diploid oysters in the April experiment ( $p = 0.013$ ,  $t$ -test) and triploid oysters in the May experiment ( $p = 0.042$ ,  $t$ -test) (Fig. 6). This increase was mainly attributable to variation in granulocyte counts, especially in April when granulocyte counts drastically increased upon *A. minutum* exposure.

Sizes (FSC) of granulocytes and hyalinocytes (Fig. 6) of oysters in the April experiment were significantly larger in triploids than in diploids, but hemocyte size was not affected by *A. minutum* exposure. In May, size and complexity (SSC) of both granulocytes and hyalinocytes were higher in triploids than in diploids. In the same experiment, *A. minutum* resulted in a significant increase in granulocyte and hyalinocyte size and in hyalinocyte complexity.

ROS production in granulocytes and hyalinocytes (Fig. 6) was significantly higher in May than in April ( $p = 0.0002$  for granulocytes and  $p = 0.0011$  for hyalinocytes,  $t$ -test). In both experiments, granulocytes of triploids produced more ROS than granulocytes of diploids ( $p = 0.0034$  in April and  $p = 0.0012$  in May, MANOVA). The same difference was observed for hyalinocytes but was only significant in April ( $p = 0.0215$ , MANOVA).

*A. minutum* exposure resulted in opposite effects in the two experiments. In the April experiment, granulocytes of oysters fed *A. minutum* produced more ROS than those of control oysters ( $p = 0.0119$ , MANOVA). In the May experiment, granulocytes and hyalinocytes of oysters fed *A. minutum* produced less ROS than those of control oysters ( $p = 0.0067$  and  $p = 0.0358$ , respectively, MANOVA).

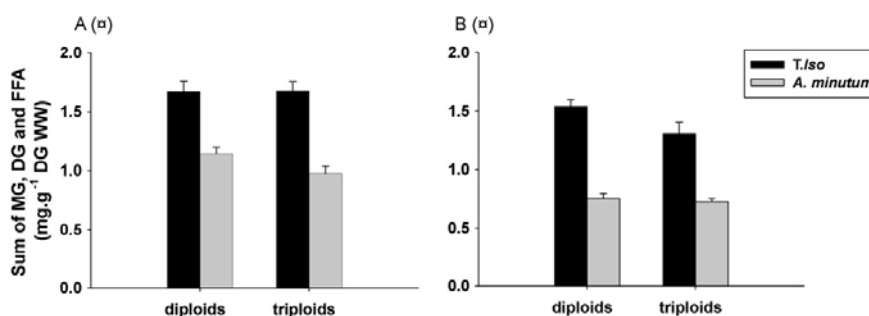


Fig. 3. Sum of monoacylglycerol (MG), diacylglycerol (DG) and free fatty acid (FFA) contents (mean of 3 pools of 4 oysters each, as  $\text{mg.g}^{-1}$  of tissue wet weight,  $\pm\text{CI}$ ) in oyster digestive gland according to ploidy and microalgal exposure, in April (A) and May (B) experiments. <sup>a</sup>Statistically significant difference according to microalgal exposures (MANOVA).

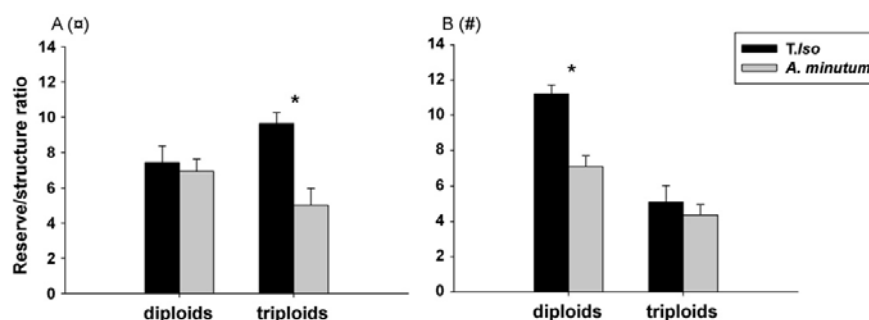


Fig. 4. Ratio between reserve (sterol ester + glycerid ether + triacylglycerol content) lipids and structural (sterol content) lipids ( $\pm\text{CI}$ ) in oyster digestive gland according to ploidy and microalgal exposure, in April (A) and May (B) experiments. <sup>a</sup>Statistically significant differences according to ploidy or microalgal exposure, respectively (MANOVA). \*Statistically significant difference according to microalgal exposure ( $t$ -test).

Neither phagocytosis nor percentage of dead cells was affected by algal exposure or ploidy.

### 3.5.2. Hemocyte and plasma phenol oxidase (PO) activities

PO in plasma was higher in April than in May ( $p=0.001$ ,  $t$ -test). In April, PO in plasma decreased in *A. minutum*-exposed oysters, significantly only for diploids ( $p=0.008$ ,  $t$ -test). There were no significant variations in PO in plasma in May. In hemocytes, PO (Fig. 7) was significantly higher in May than in April ( $p=0.0152$ ,  $t$ -test). PO in hemocytes was higher in triploids than in diploids in both

April and May experiments (respectively  $p=0.0108$  and  $p=0.046$ , MANOVA). In April, PO in hemocytes was lower in oysters fed *A. minutum* than in control oysters ( $p=0.0312$ , MANOVA). In May, PO in hemocytes was higher in diploids fed *A. minutum* as compared to control diploids ( $p=0.0189$ ,  $t$ -test) and lower in triploids ( $p=0.0458$ ,  $t$ -test).

### 3.5.3. Agglutination and hemolysis

There were no significant differences in agglutination or hemolysis titer according to algal exposure or ploidy.

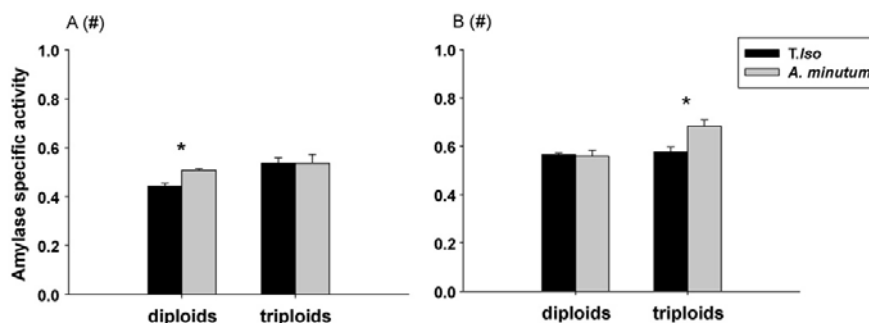


Fig. 5. Specific activity of amylase expressed as amylase activity in IU per mg of total protein (mean of 3 pools of 4 oysters each,  $\pm\text{CI}$ ) in oyster digestive gland according to ploidy and microalgal exposure, in April (A) and May (B) experiments. <sup>a</sup>Statistically significant difference according to ploidy (MANOVA); \*Statistically significant difference according to microalgal exposure ( $t$ -test).

**Table 2**  
Neutral lipid class contents (expressed as  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  of tissue wet weight) in oyster digestive glands according to ploidy and microalgal exposure, in April and May experiments. This table also includes the results of the MANOVAs testing ploidy and microalgal exposure effects separately in both experiments.

	April experiment						May experiment					
	Mean ± CI, n = 3						Mean ± CI, n = 3					
	MANOVA			MANOVA			MANOVA			MANOVA		
	P			P			P			P		
	D			D			D			D		
Diploids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Triplids	Triplids			Triplids			Triplids			Triplids		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
T. Iso	T. Iso			T. Iso			T. Iso			T. Iso		
	A. minutum			A. minutum			A. minutum			A. minutum		
Diploids	Diploids			Diploids			Diploids			Diploids		
	A											



**Table 3**

Effects of ploidy and microalgal exposure on oyster hemocyte and plasma variables, tested by MANOVA in April and May experiments.

Variables	April experiment			May experiment		
	Ploidy	Diet	Interaction	Ploidy	Diet	Interaction
Concentration of granulocytes	..	..	NS	NS	NS	NS
Concentration of agranulocytes	..	NS	NS	..	NS	NS
Concentration of aggregates	..	NS	NS	..	NS	NS
Size of granulocytes	..	NS	NS	..	..	NS
Size of hyalinocytes	..	NS	NS	..	..	NS
Complexity of granulocytes	NS	NS	NS	..	NS	NS
Complexity of hyalinocytes	NS	NS	NS	..	..	NS
% phagocytic hemocytes	NS	NS	NS	..	NS	NS
ROS production of granulocytes	..	..	NS	..	..	NS
ROS production of hyalinocytes	..	NS	NS	NS	..	NS
Hemocyte phenoloxidase SA	..	..	NS	..	NS	NS

The following variables were not presented in this table as these were not significantly affected by ploidy or microalgal exposure or the interaction (MANOVA): concentration of total hemocytes, concentration of hyalinocytes, % of dead hemocytes, and plasma variables (phenol-oxylase specific activity, agglutination titer and hemolysis titer). NS, non-significant.

.. Significant difference is indicated by  $p < 0.05$ .

.. Significant difference is indicated by  $p < 0.01$ .

... Significant difference is indicated by  $p < 0.001$ .

mitters (monoamines) appeared to be related to seasonality and reproductive cycle (López-Sánchez et al., 2009). Although specific functions of monoamines are not clearly identified yet, they are thought to be involved in re-initiation of meiosis in bivalve oocytes (Guerrier et al., 1993), control of ciliary movement (Carroll and Catapane, 2007), or spawning induction (Velez et al., 1990; Fong et al., 1996; Velasco et al., 2007).

In the present study, the general increase in measured physiological parameters is certainly determined by environmental conditions (temperature, salinity and food in the field) and we speculate that metabolism is further maintained during the experiment possibly through endocrine control. From all of the above, we infer that increasing toxin accumulation paralleled increasing metabolic and physiological activities determined by ploidy and preceding field conditions.

Major changes in free fatty acid (FFA), monoacylglycerol (MAG) and diacylglycerol (DAG) contents in the oyster digestive gland were clearly attributable to algal exposure. In both experiments, concentrations of FFA, MAG and DAG were reduced upon *A. minutum* exposure in both diploids and triploids. These compounds are generally absent in the gonad and the muscle, and only transiently observed in the digestive glands of oysters (Soudant et al., 1999). The biological significance of FFA, DAG and MAG contents is still unclear as little has been published on the subject. These lipid classes are thought to be intermediate products in the synthesis or catabolism of both structural and reserve lipids.

Upon exposure to *A. minutum*, the ratio of reserve lipids (TAG, EGLY and SE) to structural lipids (sterols) decreased in both experiments. This depletion of reserve lipids upon *A. minutum* exposure, however, appeared to partially depend upon maturation stage. The most drastic decrease upon *A. minutum* exposure occurred when oyster gametogenesis was almost absent (April experiment triploids) or predominantly terminated (May experiment diploids). In these physiological conditions, more reserve lipids resided in the digestive gland, where these energy reserves are potentially available to respond to stressful conditions. In contrast, when oysters were in late gametogenesis (April experiment diploids and May experiment triploids), reserve lipids were likely intensively transferred to the gonad and may thus be only slightly affected by *A. minutum* exposure.

As FFA, MAG and DAG concomitantly decreased with the reserve/structure ratio, we speculate that *A. minutum* negatively affects digestion of dietary lipids and/or synthesis of storage lipids. Also, it has to be noted that contents of TAG and EGLY in *A. minutum*-exposed oysters decreased as toxin accumulation

increased according to oyster groups. Nevertheless, at this stage, it is difficult to establish clear relationships between reserve lipid changes and toxin accumulation. To further progress on these aspects, it would be interesting to combine this biochemical information with histological analyses.

Specific activity of amylase (ASA) was also modulated upon *A. minutum* exposure. Overall, ASA was higher in oysters exposed to *A. minutum* than in T. Iso-fed oysters, but also higher in triploids than in diploids. As mentioned earlier, ASA, along with other metabolic activities, could partially explain the differences in toxin accumulation between diploids and triploids and between April and May experiments. Digestive enzyme activities are important in maximizing absorption and food conversion efficiencies (Huvet et al., 2003). In *C. gigas*, a positive correlation has been established between high specific amylase activity and high food assimilation (Prudence et al., 2006). In the present study, digestive enzyme activities were likely controlled by physiological status, which varied with ploidy and times of experiments. Thus, we speculate that higher amylase activity would result in higher *A. minutum* digestion and toxin release and assimilation.

These results highlight the complexity of relationships between oyster physiology and toxin accumulation. Toxin accumulation certainly depends upon the physiological status and metabolic activities of the oysters; concomitantly, toxin accumulation can interfere with the same physiological processes.

Regarding hemocyte variables, changes upon *A. minutum* exposure were mainly observed in hemocyte cell density, phenoloxidase, and ROS production. Except in mature oysters (diploids in experiment 2), *A. minutum* exposure resulted in increases in numbers of circulating hemocytes. Increase in total circulating hemocyte counts is generally considered to be an immune response to pathogens (Chu et al., 1993; Chu and La Peyre, 1993; Ford et al., 1993; Anderson et al., 1995). Many toxic chemicals can modulate densities of circulating hemocytes, which may increase or decrease according to chemical characteristics and concentrations (Auffret et al., 2002; Gagnaire, 2005; Auffret et al., 2006). Further, modulation of hemocyte counts upon *A. minutum* exposure appeared to vary according to maturation stage of the oysters. Indeed, mature diploid oysters responded in an opposite manner compared to other oyster groups by decreasing hemocyte count upon *A. minutum* exposure. Ripe oysters are known to be especially sensitive to stress and to summer mortality (Samain et al., 2007). *A. minutum* exposure, serving as an additional stress to reproductive effort, may have re-enforced the decrease in hemocyte counts occasionally observed in fully mature oysters (Delaporte et al., 2006). This

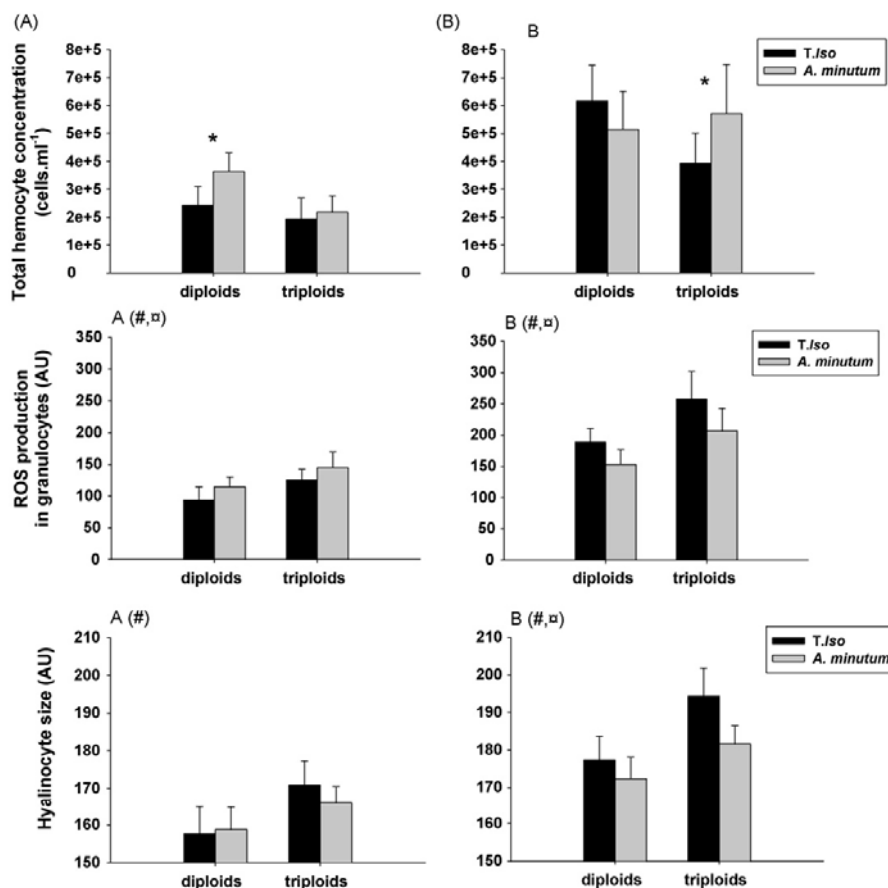


Fig. 6. Total hemocyte count (cells ml<sup>-1</sup>), ROS production in granulocytes (AU), and size of hyalinocytes (AU) according to ploidy and microalgal exposure in April (A) and May (B) experiments (mean of 12 individual oysters,  $\pm$  CI). \*#Statistically significant differences according to ploidy and microalgal exposure, respectively (MANOVA). \*Statistically significant difference according to microalgal exposure (t-test). AU: arbitrary unit.

makes changes of hemocyte concentration difficult to interpret. The strongest increase in hemocyte concentration occurred in the oyster groups showing the strongest increase in amylase activity upon *A. minutum* exposure. Hemocytes have been thought for a long time to be involved in digestion processes and digestive activities (Cheng, 1996). The observed parallel between hemocyte counts and

amylase activities may simply reflect involvement of hemocytes in microalgal digestion and nutrient assimilation.

Reactive oxygen species (ROS) production and specific activity of phenol oxidase (PO) in circulating cells were both affected by *A. minutum* exposure. ROS production is associated with internal chemical destruction of engulfed pathogens or foreign particles

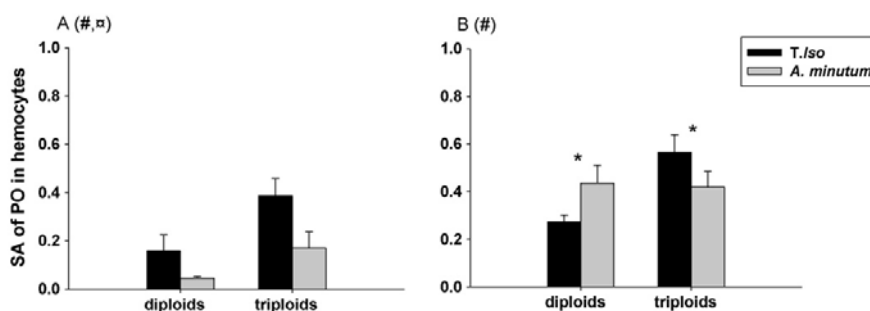


Fig. 7. Specific activity (SA) of phenoloxidase (PO) expressed as PO activity (IU) per mg of total protein in hemocytes (mean of 12 individual oysters  $\pm$  CI) according to ploidy and microalgal exposure, in April (A) and May (B) experiments. \*#Statistically significant differences according to ploidy and microalgal exposure, respectively (MANOVA). \*Statistically significant difference according to microalgal exposure (t-test).

within hemocytes (Cheng, 1996, 2000; Chu, 2000). Hemocyte ROS production may also be activated by high reproductive effort, leading some to consider reproductive activity as a physiological stress (Delaporte et al., 2006, 2007). The elevated energy demand for gamete production leads to a marked increase of whole animal oxygen consumption during gametogenesis, corresponding to an elevated basal metabolism (Shumway et al., 1988). ROS production was thus hypothesized to reflect an oxidative stress during periods of high energy expenditure, such as active gametogenesis. ROS production was previously observed to increase in ripening oysters, especially in oysters known to be genetically more sensitive to summer mortalities (Delaporte et al., 2007). In the present study, ROS production was two times higher in oysters in the May experiment than in the April experiment. This suggests that ROS production may reflect increases in metabolic activities and energy expenditure formerly “programmed” by temperature and photoperiod conditions of their rearing site. Temperature and photoperiod may accelerate metabolic activities, even for triploid oysters which produced only few mature gametes and remained on average at intermediate stages of gametogenesis.

Upon *A. minutum* exposure, hemocyte ROS production significantly increased in the April experiment and significantly decreased in the May experiment, similarly in diploid and triploid oysters. In the April experiment, the increase in ROS production may reflect an increase in metabolic activities responding to *A. minutum* exposure. On the contrary, in the May experiment, we speculate that higher toxin accumulation exceeded the “tolerance” of oysters, affecting directly and more profoundly physiological and metabolic activities leading to reduced ROS production. At this point, we can conclude confidently only that changes in ROS production upon *A. minutum* exposure do not depend directly upon reproductive activities, as near fully matured diploid oysters responded similarly to early-maturing triploid oysters. Also, as oysters in the May experiment accumulated twice the toxin of those in the April experiment, we cannot disprove the possibility that released toxins may act as a stimulant when present at low levels, while resulting in inhibitory effects when accumulated at higher concentrations. Similar observations were made in ecotoxicological studies assessing impacts of toxic chemicals upon immune functions in bivalves (Auffret and Oubella, 1997; Fournier et al., 2001; Auffret et al., 2002; Gagnaire et al., 2006). Several heavy metals were demonstrated to have a stimulatory effect upon hemocyte counts, chemotaxis, and mobility in field study. In contrast, in experimental studies, high concentrations of the same heavy metals were inhibitory to the same or related immune parameters (Auffret et al., 2002).

Phenol oxidase is activated by microbial substances and is thought to have a role in host defense in *C. gigas* (Hellio et al., 2007). PO specific activity was drastically reduced upon *A. minutum* exposure in both diploid and triploid oysters in the April experiment, but PO increased in diploids and decreased in triploids in the May experiment. Thus, mature diploid oysters respond in an opposite manner, compared to other oyster groups, to *A. minutum* exposure. *A. minutum* challenge seems to decrease the activity of PO in hemocytes from oysters at early and intermediate maturation stages, and to increase the activity in oysters with advanced maturation. Notably, PO activity decreased upon *A. minutum* exposure when concomitantly hemocyte counts increased. This suggests that hemocytes newly mobilized in the circulatory system may not be fully functional and are less able to produce PO activity.

Triploid oyster hemocytes were significantly larger (higher FSC) than those of diploid hemocytes, possibly because of their higher nuclear DNA content. Additionally, triploid oyster hemocytes were also more complex (higher SSC) than diploid hemocytes. As cell complexity is related to granule content, higher granule content

in triploid hemocytes may parallel the higher hemocyte activities (ROS production as well as PO activity).

Triploid oysters were previously reported to have statistically higher hemocyte phagocytosis, esterase, and peroxidase activities than diploid oysters (Gagnaire et al., 2007). If higher hemocyte chemical activities can confer a better tolerance to toxin accumulation, then triploid oysters may have a better ability to respond to *A. minutum* exposure than diploid oysters. As low toxin sensitivity results in high toxin accumulation (Bricelj and Shumway, 1998), triploids would be able to accumulate more toxin than diploids. Triploid hemocyte size and complexity were reduced upon *A. minutum* exposure in the May experiment but not in the April experiment. We therefore speculate that toxin accumulation was high enough to affect cell physiology, possibly through cell degeneration, upon toxin exposure.

To summarize, hemocyte responses to *in vivo A. minutum* exposure depended upon reproductive status, toxin accumulation, but also upon oyster physiological status in the field prior to collection for experiments. When considering only *A. minutum*-exposed oysters, positive linear correlations between PST accumulation and both hemocyte ROS production (granulocytes:  $R^2 = 0.55$ ,  $p < 0.01$ ; hyalinocytes:  $R^2 = 0.6$ ,  $p < 0.005$ ) and PO activity (total hemocytes:  $R^2 = 0.74$ ,  $p < 0.005$ ) were found (data not shown). These relationships indicate that these activities can be considered as good “markers” of metabolic activity useful in interpretation of physiologically dependent differences in toxin accumulation. As stated above, however, these oxidative activities also may be modulated by other sources of stress, such harmful algae. Thus, it is difficult to unravel the respective influences of physiological status vs stress encountered by oysters.

Bivalve physiological responses to *Alexandrium* spp. exposure often are thought to be related to toxins (saxitoxin and derivatives) affecting human health. It is not known, however, if these compounds are the ones affecting bivalves, or if other compounds produced by harmful algae can affect shellfish at a greater extent. Lush et al. (1997) reported that juvenile greenback flounder (*Rhombosolea taparina*) exposed to an *A. minutum* whole cell suspension showed gill damage characterized by severe epithelial swelling that was not related to PSTs. In addition to this ichthyotoxic effect of *A. minutum*, it has been reported that *A. minutum* showed potent toxic effects upon brine shrimp (*Artemia salina*) (Lush et al., 1996) and a harpacticoid copepod (*Euterpina acutifrons*) (Bagoien et al., 1996), independently of paralytic-toxin effects. Moreover, Ford et al. (2008) found no measurable effect of a PST-producing strain of *A. tamarense* on hemocytes of two bivalve species. Instead, extract from a non-PST-producing strain had a strong and consistent negative effect on hemocytes from two clam species, resulting in significantly lower adherence and phagocytosis compared to a PST-producing strain and filtered seawater controls. These studies allow us to suggest that PSTs are not the only compounds responsible of *A. minutum* effects upon oyster physiology, but other active compounds are likely bioactive as well.

## 5. Conclusion

The most striking result of this study was the difference in PST accumulation between diploid and triploid oysters: triploids accumulate about twice the toxin as diploids. This difference may be attributable to differences in physiology linked to ploidy, especially during reproduction. This finding can have important implications, in terms of oyster production and risk management.

Despite the finding that *A. minutum* exposure was not lethal to oysters, exposure to a toxin-producing microalga can significantly impact oyster physiology, as compared to non-toxic algae (*T. Iso*). *A. minutum* exposure affected several digestive and hematological



parameters, and these responses were modulated by ploidy and maturation stage. Indeed, for some physiological parameters such as phenol-oxylase activity and hemocyte concentration, ripe oysters responded in an inverted manner as compared to maturing oysters. We highlight, however, that observed effects of *A. minutum* were not only related to PSTs, but likely also to other bioactive compounds produced by *A. minutum*.

Results of the present study showed that analyses of digestive gland activities and composition (neutral lipids for example) can provide information on effects of *A. minutum* exposure upon oysters. Also, it could be productive to investigate other lipid classes, such as cell membrane constituents (polar lipids). Finally, biochemical approaches developed here can be complementary to histo-pathological observations as such methods have been successfully applied to assess impacts of toxic microalgae upon mollusks (Galimany et al., 2008).

### Acknowledgments

We thank Isabelle Queau, Luc Lebrun, René Robert, Jean Yves Quillay, Aimé Langlade, Edouard Bédier, Claudie Quéré, Florence Royer, Aurélie Lelong and Sébastien Chouinard for their help conducting the experiments and their technical assistance. Sincere thanks are due to Gary H. Wikfors for English corrections. This study was carried out with the financial support of the National Research Agency (ANR), "MODECOPHY" project 06SEST23 (2006–2009) and of the Brittany Region (EPHYTOX, 2006–2009).

### References

- Anderson, R.S., Bureson, E.M., Paynter, K.T., 1995. Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 82–89.
- Azizul, G., Seguel, M., Guzman, L., Erard-Le Denn, E., 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232, 285–295.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. In: Hellrich, K. (Ed.), *Paralytic Shellfish Poison. Biological method 959.08. Official Methods of Analysis of AOAC International*. Arlington, VA, pp. 881–882.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, L., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in western Mediterranean. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 393–405.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mar. Environ. Res.* 54, 585–589.
- Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *in vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol. A* 118, 705–712.
- Auffret, M., Oubella, R., 1995. In: Stolen, J.S., Fletcher, C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Soderhall, K., Weeks-Perkins, B.A. (Eds.), *Cytological and Cytometric Analysis of Bivalve Molluscs Hemocytes*. SOS Publication, Fair Haven.
- Bagoien, E., Miranda, A., Reguera, B., Franco, J.M., 1996. Effects of two Paralytic Shellfish Toxin producing dinoflagellates on the pelagic harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons*. *Mar. Biol.* 126, 361–369.
- Bardouil, M., Bohec, M., Cornerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* 12, 417–422.
- Barracco, M.A., Medeiros, I.D., Moreira, F.M., 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 387–404.
- Bricelj, V.M., Connell, L., Konoki, K., Mac-Quarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, W.A., Trainer, V.L., 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* 434, 763–767.
- Bricelj, V.M., Shumway, S.E., 1998. Paralytic Shellfish Toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Res. Fish. Sci.* 6, 315–383.
- Carroll, M.A., Catapano, E.J., 2007. The nervous system control of lateral ciliary activity of the gill of the bivalve mollusc *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 148, 445–450.
- Chang, F.H., Anderson, D.M., Kulis, D.M., Till, D.G., 1997. Toxin production of *Alexandrium minutum* (dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand. *Toxicon* 35, 393–409.
- Cheng, T.C., 2000. Cellular defense mechanisms in oysters. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*, vol. 5. Science Publishers Inc., Enfield, pp. 43–83.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant, College Park, MD, USA, pp. 299–333.
- Chou, H.N., Chen, Y.M., Chen, C.Y., 2004. Variety of PSP toxins in four culture strains of *Alexandrium minutum* collected from southern Taiwan. *Toxicon* 43, 337–340.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*, vol. 5. Science Publishers Inc., Enfield, pp. 1–42.
- Chu, F.L.E., La Peyre, J.F., 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. *Dis. Aquat. Org.* 16, 223–234.
- Chu, F.L.E., La Peyre, J.F., Bureson, C.S., 1993. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: salinity effects. *J. Invertebr. Pathol.* 3, 226–232.
- Delaporte, M., Chu, F.L., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J.F., Soudant, P., 2007. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T. Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343, 261–275.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.F., 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254, 571–582.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain, J.F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species—*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053–3064.
- EFSA Journal, 2009. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – summary on regulated marine biotoxins. *EFSA J.* 1306, 1–23.
- Emura, A., Matsuyama, Y., Oda, T., 2004. Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori*. *Harm. Algae* 3, 29–37.
- Fabioux, C., Huvel, A., Le Souche, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458–470.
- Fernández-Reiz, M.J., Navarro, J.M., Contreras, A.M., Labarta, U., 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquat. Toxicol.* 87, 245–251.
- Fernández-Reiz, M.J., Labarta, U., Navarro, J.M., Velasco, A., 2001. Enzymatic digestive activity in *Mytilus chilensis* (Hupé 1954) in response to food regimes and past feeding history. *J. Comp. Physiol. B* 171, 449–456.
- Fong, P.P., Deguchi, R., Kyozuka, K., 1996. Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from central Japan. *Biol. Bull.* 191, 27–32.
- Ford, S.E., Bricelj, V.M., Lambert, C., Paillard, C., 2008. Deleterious effects of a nonPST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarense* on bivalve hemocytes. *Mar. Biol.* 154, 241–253.
- Ford, S.E., Kanaley, S.A., Littlewood, D.T.J., 1993. Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 49–57.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P., 2001. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161, 201–211.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Faury, N., Kerdudou, N., Le Moine, O., Renault, T., 2007. Analysis of hemocyte parameters in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field. Comparison of hatchery diploids and diploids from natural beds. *Aquaculture* 264, 449–456.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T., Renault, T., 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol. Toxicol.* 22, 1–14.
- Gagnaire, B., 2005. Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Ph.D. Thesis. La Rochelle.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégarret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. *Harm. Algae* 7, 702–711.
- Guerrier, P., Lederer-David, C., Moreau, M., 1993. Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*. *Dev. Biol.* 159, 474–484.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234–236.
- Hégarret, H., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., 2009. Biotoxin contamination and shellfish safety. In: Shumway, S.E., Rodrick, G.E. (Eds.), *Shellfish Safety and Quality*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 43–80.
- Hégarret, H., Wikfors, G.H., Shumway, S.E., 2008. *In vitro* interactions between several species of harmful algae and hemocytes of bivalve molluscs. In: *Proceedings of the 2007 International Harmful Algae Conference*, Copenhagen, Denmark.
- Hégarret, H., da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S.E., Soudant, P., 2007a. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquat. Toxicol.* 84, 469–479.
- Hégarret, H., Wikfors, G., Soudant, P., Lambert, C., Shumway, S., Bérard, J., Lassus, P., 2007b. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A.*

- catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. Mar. Biol. 152, 441–447.
- Hello, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. Fish Shellfish Immunol. 22, 433–440.
- Huss, H.H., 2003. Aquatic biotoxins. Chapter 5.1.5. In: Huss, H.H., Ababouch, L., Gram, L. (Eds.), Assessment and Management of Seafood Safety and Quality. FAO Fisheries Technical Paper, p. 239.
- Huvet, A., Daniel, J.Y., Quéré, C., Dubois, S., Prudence, M., Van Wormhoudt, A., Sello, D., Samain, J.F., Moal, J., 2003. Tissue expression of two  $\alpha$ -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. Aquaculture 228, 321–333.
- Johnson, R.M., Shrimpton, J.M., Cho, G.K., Heath, D.D., 2007. Dosage effects on heritability and maternal effects in diploid and triploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Heredity 98, 303–310.
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M., Navarro, J., Velasco, A., 2002. Enzymatic digestive activity in epifaunal (*Mytilus chilensis*) and infaunal (*Mulinia edulis*) bivalves in response to changes in food regimes in a natural environment. Mar. Biol. 140, 669–676.
- LaFont, R., 2000. The endocrinology of invertebrates. Ecotoxicology 9, 41–57.
- Lambert, C., Moal, J., Le Moullac, G., Pouvreau, S., 2008. Mortality risks associated with physiological traits of oysters during reproduction. In: Samain, J.F., McCombie, H. (Eds.), Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Mostre Project. Ifremer/Quae, Versailles, France, pp. 63–106.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. Fish Shellfish Immunol. 15, 225–240.
- Lassus, P., Baron, R., Garen, P., Truquet, P., Masselin, P., Bardouil, M., Leguay, D., Amzil, Z., 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. Aquat. Living Resour. 17, 207–214.
- Lassus, P., Bardouil, M., Ledoux, M., Murail, I., Bohec, M., Truquet, P., Frémy, J.-M., Rohmer, V., 1992. Paralytic phycotoxin uptake by scallops (*Pecten maximus*). Aquat. Living Resour. 5, 319–324.
- Le Moine, S., Sello, D., Moal, J., Daniel, J.Y., San Juan, S.F., Samain, J.F., Van Wormhoudt, A., 1997. Amylase on *Pecten maximus* (mollusca, bivalves): protein and cDNA characterization; quantification of the expression in the digestive gland. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 6, 228–237.
- Li, S.C., Wang, W.X., Hsieh, D.P.F., 2002. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. Mar. Environ. Res. 53, 145–160.
- López-Sánchez, J.A., Maeda-Martínez, A.N., Croll, R.P., Acosta-Salmón, H., 2009. Monoamine fluctuations during the reproductive cycle of the Pacific lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 154, 425–428.
- Lucas, A., Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. Aquaculture 44, 187–200.
- Lush, G.J., Hallegraeff, G.M., Munday, B.L., 1997. Histopathological effects in juvenile green black flounder *Rhombosolea taparina* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*. In: Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 609–610.
- Lush, G.J., Hallegraeff, G.M., Munday, B.L., 1996. High toxicity of the red tide dinoflagellate *Alexandrium minutum* to the brine shrimp *Artemia salina*. In: Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 389–392.
- Magoulas, A., Kotoulas, G., Gerard, A., Naciri-Graven, Y., Dermitzakis, E., Hawkins, A.J.S., 2000. Comparison of genetic variability and parentage in different ploidy classes of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Genet. Res. 76, 261–272.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 59, 95–110.
- Marie, D., Partensky, F., Vaulot, D., Brussaard, C., 1999. Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. In: Current Protocols in Cytometry. John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 11.11.11–11.11.15.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., Grassé, P.P., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson, Paris, p. 345.
- Morin, P., Erard-Le Denn, E., Maguer, J.F., Madec, C., Videau, C., Legrand, J., Macé, E., 2000. Étude des causes de prolifération de microalgues toxiques en mer: cas d'*Alexandrium*. Final AELB report, Convention 7.98.9476, p. 135.
- Narahashi, T., 1988. Mechanism of tetrodotoxin and saxitoxin action. In: Tiu, A.T. (Ed.), Handbook of Natural Toxins. Marine Toxins and Venoms, vol. 3. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 185–210.
- Olive, P.J.W., 1995. Annual breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony. J. Therm. Biol. 20, 79–90.
- Oshima, Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for Paralytic Shellfish Toxins. J. AOAC Int. 78, 528–532.
- Prudence, M., Moal, J., Boudry, P., Daniel, J.Y., Quéré, C., Jeffroy, F., Mingant, C., Ropert, M., Bedier, E., Van Wormhoudt, A., Samain, J.F., Huvet, A., 2006. An amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*. Anim. Genet. 37, 348–351.
- Reid, H.L., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., Birkbeck, T.H., 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis. Aquat. Org. 56, 249–258.
- Riddle, N.C., Kato, A., Birchler, J.A., 2006. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays*. Theor. Appl. Genet. 114, 101–111.
- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. Aquaculture 268, 227–243.
- Samain, J.F., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R., 1977. Trypsine, amylase et protéines du zooplancton: dosage automatique et manuel. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 29, 279–289.
- Saout, C., Quéré, C., Donval, A., Paulet, Y.-M., Samain, J.-F., 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). Aquaculture 172, 301–314.
- Shumway, S.E., Sherman-Caswell, S., Hurst, J.W., 1988. Paralytic shellfish poisoning in Maine: monitoring a monster. J. Shellfish Res. 7, 643–652.
- Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 123, 209–222.
- Tillmann, U., Alpermann, T., John, U., Cembella, A., 2008. Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists. Harm. Algae 7, 52–64.
- Velasco, L.A., Barrosa, J., Acosta, E., 2007. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture 266, 153–165.
- Velez, A., Alifa, E., Azuaje, O., 1990. Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic tropical scallop, *Pecten ziczac*. Aquaculture 84, 307–313.





### 3.3. Article 5 – Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*.

Harmful Algae 9 (2010) 427–439



Contents lists available at ScienceDirect

Harmful Algae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/hal](http://www.elsevier.com/locate/hal)



#### Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*

Hansy Haberkorn<sup>a</sup>, Christophe Lambert<sup>a</sup>, Nelly Le Goïc<sup>a</sup>, Jeanne Moal<sup>b</sup>, Marc Suquet<sup>c</sup>,  
Marielle Guéguen<sup>d</sup>, Inke Sunila<sup>e</sup>, Philippe Soudant<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

<sup>b</sup> Ifremer Centre de Brest, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, BP 70, 29280 Plouzané, France

<sup>c</sup> Ifremer Station Expérimentale d'Argenton, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, 29840 Argenton, France

<sup>d</sup> Ifremer Centre de Nantes, Laboratoire Phycotoxines, BP 21105, 44311 Nantes, France

<sup>e</sup> Department of Agriculture, Bureau of Aquaculture, P.O. Box 97, Milford, CT 06460, USA

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 17 November 2009

Received in revised form 15 January 2010

Accepted 16 January 2010

##### Keywords:

Harmful algae

*Alexandrium minutum*

Oyster

Nutrition-related processes

Reproductive output

#### ABSTRACT

This study assessed the effects of an artificial bloom of the toxin-producing dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, upon nutrition related processes and reproductive output of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Oysters were exposed to *A. minutum*, Paralytic Shellfish Toxins (PST) producer and compared to a control batch of oysters fed *Isochrysis galbana* clone Tahitian (T.Iso). The experiment was performed in June 2008, when oysters were found ripe. Several physiological variables of oysters, such as PSTs accumulation, digestive gland and histological observations as well as spermatozoa quality, were measured at the end of the exposure. Results indicate that the digestive gland was greatly impacted upon *A. minutum* exposure. Monoacylglycerol and diacylglycerol contents as well as phospholipids (mainly phosphatidylcholine) drastically decreased in the digestive gland of oysters exposed to *A. minutum* compared to control oysters. At the same time, many oysters exposed to the harmful microalga presented a strong inflammatory response in different tissues of the digestive gland: in intestine as well as in digestive ducts and tubules. Spermatozoa in oysters exposed to *A. minutum* were morphologically and functionally modified compared to spermatozoa of control oysters. Indeed, spermatozoa were less motile and had lower ATP content in oysters exposed to *A. minutum*. Meanwhile, spermatozoa produced by control oysters showed higher percentage of mortality and relative DNA content than those produced by *A. minutum* exposed oysters. Finally, the characteristics of the mitochondria of spermatozoa also appeared to be modified upon *A. minutum* exposure. The results of this study suggests that an exposure of oysters to *A. minutum*, reducing energy status and motility of spermatozoa associated to morphological changes at the cellular and sub-cellular levels, can have consequences on spermatozoa fertility and reproduction success.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Among harmful algae, *Alexandrium* species have worldwide distribution, and some species have caused many PST-related events (Kim et al., 2005). The dinoflagellate *Alexandrium minutum* was observed in several countries in the world (North America, Australia, Taiwan, New Zealand and Jamaica for example) and in Europe, such as Spain, Ireland, Italy, Greece and France (Lilly et al., 2005; Ignatiades et al., 2007; Ranston et al., 2007). Moreover, this species was known to produce Paralytic Shellfish Toxins (PSTs).

Several commercial bivalve species, such as oysters, are known to accumulate PSTs by feeding on PST-producing microalga (Oshima et al., 1990; Bricelj and Shumway, 1998). Mode of action of PSTs involved a reversible and highly specific block of ion transport by the sodium channel and thus of the action potential in excitable membranes (nerve and muscle fibers) (Narahashi, 1988; Bricelj and Shumway, 1998). Adductor-muscle paralysis of oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), exposed to cultured *Alexandrium fundyense* (Balech, 1985) was observed by Hégaret et al. (2007).

*Alexandrium* exposure is also known to have a negative impact on filtration and ingestion in bivalves (Bardouil et al., 1993; Wildish et al., 1998; Lassus et al., 1999; Li et al., 2001; Navarro et al., 2008). Inhibition of clearance was observed as the initial

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 49 86 23; fax: +33 2 98 49 86 45.  
E-mail address: [soudant@univ-brest.fr](mailto:soudant@univ-brest.fr) (P. Soudant).

feeding response of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) exposed to *A. tamarense* (Lebour, 1925) and *A. fundyense* (Wildish et al., 1998). Similarly, Lassus et al. (1999) observed that exposing oysters, *C. gigas*, to cultured *A. minutum* (Halim, 1960) induced significant inhibition of shell-valve activity and clearance, filtration, and biodeposition rates.

Exposure of bivalves to harmful microalga can also affect digestion and energy allocation. Li et al. (2002) assessed the effects of *A. tamarense* on the energy budget, quantified as scope for growth (SFG), of the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758), and the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). This study demonstrated that increase in PST burden was associated with significant reduction of SFG in both clams and mussels, primarily because of decreases in absorption efficiency (Li et al., 2002). This reduction in SFG can hypothetically be linked to modification of digestive metabolism (Fernández-Reiriz et al., 2008). Also, a recent study (Haberkorn et al., in press) demonstrated that reserve lipids in digestive glands of *C. gigas* are modified upon exposure to *A. minutum*. Free fatty acid, monoacylglycerol, and diacylglycerol contents, as well as the ratio of reserve lipids (triacylglycerol, ether glycerides and sterol esters) to structural lipids (sterols), decreased significantly in digestive glands of oysters exposed to *A. minutum* compared to oysters fed a nutritious, control diet of *Isochrysis* sp. (Haberkorn et al., in press).

Some recent studies have described inflammatory responses (aggregation/infiltration of hemocytes in organs and/or hemocytes in diapedesis through epithelia) in different tissues of bivalve species exposed to several harmful microalga (Galimany et al., 2008a,b,c; Hégaret et al., 2009). Mussels (*Mytilus edulis*, Linnaeus, 1758) exposed to *A. fundyense* showed an inflammatory response consisting of diapedesis of hemocytes into the alimentary canal and hemocyte migration into the connective tissue between the gonadal follicles (Galimany et al., 2008a). These findings suggest that harmful-algal exposure can elicit activation of defense or repair mechanisms in response to resulting tissue lesions in bivalves.

Also, according to Galimany et al. (2008a,b,c) and Hégaret et al. (2009), the digestive gland is generally the organ most-affected by HAB exposure. Thus, as the structure of the digestive gland is often observed to be drastically modified, it appears pertinent to study the structural components of cell membranes in the digestive gland. Phospholipids and sterols are essential structural components of all cell membranes and may be used as markers of membrane modifications. Phospholipid alterations may occur through the oxidation of these labile molecules. Moreover, inflammatory responses are known to be induced by lipid oxidation in vertebrate models (reviewed in Fantone and Ward, 1982). In mussels (*M. edulis*) exposed to *A. fundyense*, increased ceroidosis in tissues was probably attributable to lipid peroxidation generated by ingestion of the harmful alga (Galimany et al., 2008a). Concurrently, an inflammatory response was observed in the mussel alimentary canal (Galimany et al., 2008a). These findings suggested a possible link between changes in digestive-gland lipids and inflammatory response in the same organ.

Beyond the direct effects of HABs described above, it is unknown how HAB exposure affects other physiological functions, such as reproduction. Relationships between food quality and quantity, energy storage, and reproduction are now well established in *C. gigas* (Soudant et al., 1999; Berthelin et al., 2000; Royer et al., 2008; Rico-Villa et al., 2009). These observations suggest that HAB exposure, by affecting nutrition-related functions, may impact reproduction processes and gamete output. Indeed, it is well-established that reserve lipids play an important role in gamete production and larval development (Soudant et al., 1996, 1998). Consequently, the effects of harmful algae on digestive-gland lipids, as demonstrated by Haberkorn et al. (in press), may further affect gametogenic processes, reproduction output and larval development.

Most studies concerning the effects of harmful algae on reproductive cycles of bivalves are focusing on embryonic and larval development (Yan et al., 2001, 2003; Springer et al., 2002; Leverone et al., 2006; Padilla et al., 2006; Shumway et al., 2006). Some studies have observed alterations induced by noxious compounds on quality of gametes produced by oysters (Nice, 2005; Ringwood et al., 2004; Yurchenko et al., 2009), but there are no studies addressing the effects of harmful algae on gametes produced by HAB-exposed bivalve broodstock. Spermatozoa quality, and especially spermatozoa motility, influence successful fertilization in free-spawning invertebrates (Nice, 2005). A positive relationship between ATP content and spermatozoan motility has been reported in carp *Cyprinus carpio* (Percec et al., 1995). Other sperm characteristics (viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and DNA integrity) in relation to fertilizing capacity can be accurately and rapidly measured using flow cytometry coupled with fluorescent markers (Gillan et al., 2005; Cordelli et al., 2005). For example, mitochondrial membrane potential measured with JC-1 was shown to be reasonably predictive of *in vitro* fertilisation rates (higher in a group with high mitochondrial membrane potential) (Kasai et al., 2002).

The purpose of the present study was to determine the effects of an artificial bloom of the toxin-producing dinoflagellate, *A. minutum* (strain AM89BM) on nutrition-related processes and reproduction of *C. gigas*; to do so, the digestive gland was assessed for histopathological condition, toxin accumulation, lipid composition, and amylase activity. Further, spermatozoa quality was measured in oysters (*C. gigas*) after 4 days of exposure to *A. minutum* or *Isochrysis* sp. (clone Tahitian T.Iso) as a nutritious, non-toxic control.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological material

#### 2.1.1. Oysters

Diploid Pacific oysters, *C. gigas*, used in the experiment were obtained from an oyster producer at Île de Kerner (Morbihan, France). Mean total oyster fresh weight was  $11.9 \pm 1.2$  g and mean shell length was  $62.6 \pm 2.7$  mm.

#### 2.1.2. Algal culture

*A. minutum* (strain AM89BM – isolated in Bay of Morlaix, France, in 1995) was grown in 10-l batch culture using autoclaved seawater filtered through a 1- $\mu$ m filter and supplemented with L1 nutrient enrichment (Guillard and Hargraves, 1993). Cultures were incubated at  $16 \pm 1$  °C and 100  $\mu$ mol photon  $m^{-2} s^{-1}$ , with a dark:light cycle of 12:12 h. *A. minutum* was harvested after 12 days, still in exponential growth phase under our conditions. At this stage, this strain produced  $1.3 \pm 0.1$  pg saxitoxin equivalent (STX equiv.) per cell (measured by the method of Oshima, 1995).

*Isochrysis galbana*, clone Tahitian (T.Iso), cultures were obtained from the Argenton hatchery (Ifremer, France). Cultures were produced in 300-l cylinders containing 1- $\mu$ m filtered seawater enriched with Conway medium at  $24 \pm 1$  °C, air-CO<sub>2</sub> (3%) mix aerated, and with continuous light. T.Iso was harvested in the exponential growth phase (4–5 days) for the feeding experiments.

### 2.2. Experimental design of *A. minutum* exposures

This experiment was performed on mid-June 2008. To proceed, 120 oysters were placed randomly in six 15-l tanks (20 oysters per tank). Oysters were acclimated for 10 days with a continuous flow of 14 ml  $min^{-1}$  of seawater (filtered through a 0.5- $\mu$ m filter) with T.Iso at  $5 \times 10^5$  cells  $ml^{-1}$  at  $16 \pm 1$  °C. After acclimation, oysters were fed continuously for 4 days at 14 ml  $min^{-1}$  with  $5 \times 10^5$  cells  $ml^{-1}$  of T.Iso



(3 control tanks) or with  $5 \times 10^3$  cells  $\text{ml}^{-1}$  of *A. minutum* (3 treatment tanks). These two different cell densities were used to provide the same bio-volume of microalga to oysters because the cellular volume of *A. minutum* is about  $100\times$  higher than that of *T.Iso*.

### 2.3. Oyster sampling

At the end of the algal exposure, all oysters were sampled and distributed as follows. For each tank (20 oysters), five oysters were used for histological diagnosis, and five oysters were used for individual plasma and hemocyte variable measurements (data not shown) and condition index. Pooled digestive glands from another 10 oysters from each tank were used to measure toxins, neutral and polar lipid contents, and amylase activity. Prior to dissection of digestive glands, male oysters (8 from the control treatment and 8 from the *A. minutum* treatment) were selected to assess spermatozoa quality.

### 2.4. Histology

A 4-mm cross-section of each of the five oysters sampled for histology, including digestive gland, gills, mantle, and gonad, was taken. Adductor muscles were dissected separately. Dissected tissues were fixed in Davidson's fixative (Shaw and Battle, 1957) for 48 h. Cross-sections and muscles were dehydrated in ascending ethanol solutions, cleared with xylene, and embedded in paraffin wax. Five-micrometer thick sections were cut, mounted on glass slides, and stained with Harris' hematoxylin-eosin (Martoja et al., 1967). Slides were examined under a light microscope.

#### 2.4.1. Gametogenic stage

Gametogenic stage was determined according to the reproductive scale established by Mann (1979).

#### 2.4.2. Pathological conditions: intensity of pathologies

Gills, gonads, style sac, intestinal groove, intestine, digestive ducts, and digestive tubules were present in all cross-sections and compared between treatments.

After a preliminary diagnosis of all slides (*A. minutum* exposed and *T.Iso*-exposed oysters), a list of the most common pathological conditions per organ was established as follows:

- digestive gland (intestinal groove, intestine, digestive ducts and digestive tubules): (i) surrounding hemocytes and (ii) hemocytes in diapedesis in the epithelium;
- gills: presence of mucus;
- muscle: (i) myoatrophy, (ii) wavy-pattern degeneration and (iii) hyaline degeneration.

A semi-quantitative scale was defined to classify the intensity of each pathological condition. Each pathological condition was graded as (i) absence or very light (stage 0), (ii) light-moderate (stage 1), and (iii) heavy (stage 2). Based upon this scale, a mean intensity of each pathology was calculated for each specific tissue as follows:

$$\frac{\sum (\text{stage}_{\text{individual } 1} + \text{stage}_{\text{individual } 2} + \dots + \text{stage}_{\text{individual } n})}{n}$$

(where  $n$  is the number of diagnosed animals per treatment).

#### 2.4.3. Pathological conditions: general status

To estimate the total pathological status of the digestive gland and the muscle for each microalgal-exposure treatment, mean number of pathologies (simply defined here as presence or absence) was calculated as follows:

$$\text{Mean number pathologies in digestive gland or in muscle} = \frac{\sum (\text{number of pathologies}_{\text{individual } 1} + \text{number of patho-}}$$

$$\text{logies}_{\text{individual } 2} + \dots + \text{number of pathologies}_{\text{individual } n})}{n}$$

(where  $n$  is the number of diagnosed animals per treatment).

### 2.5. Condition index

To assess oyster-meat dry weight, soft tissues were removed from shells and placed in a pre-weighed aluminum cup. Shell and meat were dried for 48 h at  $70^\circ\text{C}$  and then weighed. Condition index of each, individual oyster was then calculated as described previously (Lucas and Beninger, 1985), following the formula:  $(\text{g dry meat weight/g dry shell weight}) \times 100$ .

### 2.6. Digestive-gland variables

Just after dissection, digestive glands were frozen immediately in liquid nitrogen, weighed, pooled (1 pool of 10 digestive glands per tank), and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Later, pools were ground with a Danguomeau apparatus in liquid nitrogen and divided for three different analyses.

#### 2.6.1. Toxin content

One gram of ground digestive gland (DG) was extracted in 2 ml of 0.1N HCl (2, v/v) at  $4^\circ\text{C}$ . After centrifugation ( $3000 \times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ), the pH of each extract was adjusted. If above 3.0, pH was adjusted to 3.0 with 12N HCl. After half-dilution, supernatants were ultra-filtered (20 kDa, Sartorius Centrisart) and stored at  $4^\circ\text{C}$  until analysis. PSTs were analyzed by ion-pairing, high-performance liquid chromatography (IPPLC) according to the method of Oshima (1995). The molar concentration ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) was converted into  $\mu\text{g STX equiv. } 100 \text{ g}^{-1}$  of digestive gland using the conversion factors of Oshima (1995). Results were expressed as  $\mu\text{g STX equiv. } 100 \text{ g}^{-1}$  of digestive gland wet weight.

#### 2.6.2. Lipid-class contents

Two-hundred and fifty milligrams of ground DG was extracted in 6 ml of Folch solution (chloroform:methanol 2:1). Lipid classes were analyzed by high-performance, thin-layer chromatography (HPTLC) on HPTLC glass plates (1010 mm) pre-coated with silica gel 60 from Merck (Darmstadt, Germany).

For neutral lipids, a preliminary run was carried out to remove possible impurities using hexane:diethyl ether (1:1), and the plate was activated for 30 min at  $110^\circ\text{C}$ . Lipid samples (4  $\mu\text{l}$ ) were spotted on the plates by the CAMAG automatic sampler (CAMAG, Switzerland). The neutral lipids were separated with a solvent system containing hexane:diethyl ether:acetic acid (20:5:0.5).

For polar lipids, a preliminary run was carried out to remove possible impurities using methyl-acetate:iso-propanol:chloroform:methanol:KCl 0.25% (10:10:10:4:3.6), and the plate was activated for 30 min at  $110^\circ\text{C}$ . Lipid samples (6  $\mu\text{l}$ ) were spotted on the plates by the CAMAG automatic sampler. The polar lipids were separated with the above solvent system.

Lipid classes appeared as black spots after dipping plates in a cupric-sulfate, phosphoric-acid solution and heating for 20 min at  $160^\circ\text{C}$  (charring). Seven neutral-lipid classes (free fatty acids, sterol esters, glycerid ethers, monoacylglycerol, diacylglycerol, triacylglycerol, sterols) and six polar lipid classes (cardiolipin = bisphosphatidylglycerol, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol + ceramide aminoethylphosphonate, that migrate together) were identified based upon authentic standards (Sigma–Aldrich, France) and coloring techniques.

The charred plates were read by scanning at 370 nm, and black spots were quantified using Wincats software (CAMAG, Switzerland). Results were expressed as mg of each identified lipid class per g of digestive gland wet weight.

### 2.6.3. Amylase activity

Two hundred milligrams of DG was homogenized in 1 ml of distilled water. Two hundred microliters of this solution were added to 10  $\mu$ l of a 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  solution before analysis to assess amylase activity. Amylase activity was then assayed by determination of starch hydrolysis according to the iodine reaction (Samain et al., 1977) modified by Le Moine et al. (1997). One unit of alpha-amylase was defined as the amount of enzyme that degrades 1 mg  $\text{min}^{-1}$  starch at 45 °C.

To assess specific activity of amylase, total proteins were determined using the BCA Protein Assay (Biorad). For protein extraction, 200  $\mu$ l of the above solution was added to 200  $\mu$ l of a 2N NaOH solution. Protein analysis was carried out on 10  $\mu$ l of 1/10 diluted samples according to the manufacturer's description. Briefly, 200  $\mu$ l of dye reagent was added to 10  $\mu$ l of sample and incubated at 37 °C for 1 h, and the absorbance was measured at 595 nm. Sample ODs were compared to a standard curve of Bovine Serum Albumin (BSA), and results were expressed as mg protein  $\text{ml}^{-1}$ . Results are expressed as amylase activity (in IU) per mg of total protein.

### 2.7. Spermatozoa quality

Oyster gonads were incised, and a sample of gametes was checked under the light microscope to determine the sex of each individual. When identified as male, spermatozoa were sampled, counted (under dark field microscope), and adjusted to  $1 \times 10^7$  cells per ml in filtered sterile seawater (FSSW).

#### 2.7.1. Flow cytometric analysis

Analysis of spermatozoa viability, DNA content, and mitochondrial membrane potential were performed using a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipped with standard optics and a 488 nm argon laser.

#### 2.7.2. Assessment of viability

An aliquot of 100  $\mu$ l of spermatozoa suspension from each selected, individual, male oyster was transferred into a tube containing 900  $\mu$ l FSSW. Spermatozoa DNA was stained with two fluorescent DNA/RNA specific dyes (1% final concentration for both), SYBR Green I (Molecular probes, Eugene, OR, USA, 1/1000 of the DMSO commercial solution), and propidium iodide (PI, Sigma, St Quentin Fallavier, France, final concentration of 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) in the dark at 18 °C for 10 min before flow-cytometric analysis. PI permeates only spermatozoa that lose membrane integrity and are considered to be dead (necrotic); whereas, SYBR Green I permeates both dead and live cells. SYBR Green and PI fluorescences were measured at 500–530 nm (green) and at 550–600 nm (orange), respectively, by flow cytometry. This method distinguished viable, “dying” (PI partially incorporated) and dead cells. Thus, by counting the cells stained by SYBR Green and cells stained by PI, it was possible to estimate the percentage of dead cells in each sample.

#### 2.7.3. Estimation of relative DNA content

On the above stained samples, relative DNA content of spermatozoa was estimated using fluorescence intensity of SYBR Green I in spermatozoa and expressed as arbitrary units (A.U.) of green fluorescence.

#### 2.7.4. Assessment of mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane potential of oyster spermatozoa was measured using the potential-dependent J-aggregate-forming delocalized lipophilic cation, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide (JC-1, Molecular probes, Eugene, OR, USA). This probe enters selectively into mitochondria

and exists as two forms, monomeric or aggregate, depending upon membrane potential (Reers et al., 1991). The JC-1 monomer form predominates in mitochondria with low membrane potential and emits in the green wavelength (525–530 nm). The JC-1 aggregate form accumulates in mitochondria with high membrane potential and emits in the high orange wavelength (590 nm). JC-1 forms can change reversibly.

Eight hundred microliters of the spermatozoa suspension (previously adjusted to  $1 \times 10^7$ ) was transferred into a tube previously load with 190  $\mu$ l FSSW and 10  $\mu$ l JC-1 (0.5 mM). Samples were incubated for 10 min at room temperature. After incubation, 100  $\mu$ l of JC-1-stained sample was diluted in 900  $\mu$ l FSSW and stored on ice prior to flow-cytometric analysis. Fluorescence intensities of JC-1 monomers and aggregates were quantified, respectively, by FL1 and FL2 detectors of the flow cytometer. The JC-1 aggregate/monomer ratio is assumed to be proportional to mitochondrial membrane potential (Reers et al., 1991; Cossarizza et al., 1996). FL1 and FL2 fluorescence intensities are volume-dependent when their ratio is constant at a given membrane potential (Reers et al., 1991).

#### 2.7.5. Motility

The percentage of motile spermatozoa was assessed using a two-step dilution in a salt sperm-activating solution “Moti-gigas” (Brizard et al., 2001) and observed through a dark-field microscope. Percentage of motile spermatozoa was estimated by observations of three optical fields. Results were expressed as mean  $\pm$  CI percentage of motile spermatozoa.

#### 2.7.6. ATP content

For intracellular ATP content, sperm samples (15  $\mu$ l) were frozen in liquid nitrogen after dilution in “Store-gigas” (135  $\mu$ l, Brizard et al., 2001) according to manufacturer procedures. ATP content was determined by bioluminescence (ATPlite Luminescence Assay System, Perkin – Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek). Results were expressed as nmol of ATP per  $10^9$  spermatozoa.

### 2.8. Statistical analysis

Differences between microalgal treatments were analyzed statistically using Student's *t*-test (after Kolmogorov–Smirnov test to check normal distribution of data) to assess differences linked to treatment for physiological and spermatozoa variables.

Variables expressed as ratio or percentage were transformed as arcsin(square root) before statistical analysis, but presented as non-transformed data in figures.

Intensity of each pathological condition observed by histology was compared statistically using the Mann–Whitney *U*-test to assess differences attributable to microalgal exposure. For the sum of binary pathological data (presence/absence), the *t*-test was used to assess differences attributable to microalgal exposure.

Statistical analyses were performed using Statgraphics Plus statistical software (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA). Results were considered significant when *p*-value was  $<0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Histology

#### 3.1.1. Gametogenic stage

There were 33% males and 67% females in the cohort of oysters fed T.Iso, and 53% males and 47% females in oysters exposed to *A. minutum*. There was no significant difference ( $p=0.27$ ; Chi-squared; contingency table) in sex ratio between the *A. minutum* and T.Iso conditions. All analyzed oysters were ripe (stage 3).



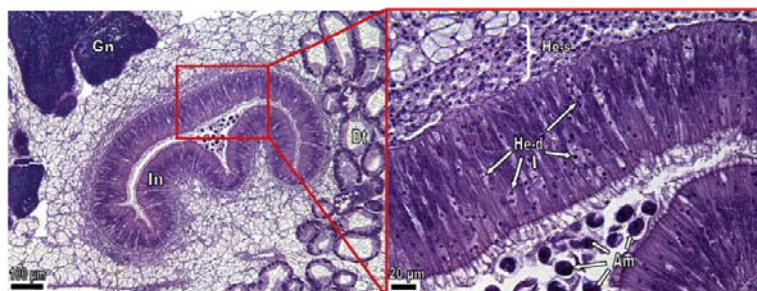


Fig. 1. An inflammatory response in the intestine of an *A. minutum*-exposed oyster, with aggregations of hemocytes in the connective tissue surrounding the intestine and hemocytes in diapedesis through the intestine epithelium. Hematoxylin-eosin stained paraffin sections. Intestine (In), gonads (Gn) and digestive tubules (Dt) of *C. gigas*. *A. minutum* cells (Am), surrounding hemocytes (He-s) and hemocytes in diapedesis (He-d).

### 3.1.2. Pathological conditions: intensity of pathologies

Digestive tubules of all oysters (both microalgal treatments) showed a star-shape in the lumen formed by digestive cells, indicating that the oysters were actively feeding and absorbing. Some intact cells of *A. minutum* were observed in the intestinal groove and intestine of oysters exposed to this microalga (cross-sections did not demonstrate the stomach, but did show style sac and intestinal groove). No intact cells of *T.iso* were observed in any part of the digestive gland, and no *A. minutum* cells were observed in digestive ducts and tubules.

Most intense pathological conditions described hereafter were observed in oysters exposed to *A. minutum*. Presence of pathological conditions in control oysters was occasionally observed but can be considered as pre-existing, background pathologies attributable to unknown environmental irritants in the field.

Pathological conditions observed in the digestive gland consisted most frequently of inflammatory responses characterized by hemocyte aggregations around the intestinal groove and intestine, and to a lesser extent around digestive ducts and tubules (Figs. 1 and 2). Intensities of hemocyte aggregations in the intestinal groove and intestine were significantly higher in oysters exposed to *A. minutum* than in the controls (Table 1).

Hemocytes in diapedesis (migration of hemocytes through the epithelia) were also observed in the digestive gland (Figs. 1 and 2). Intensities of hemocytes in diapedesis in intestinal groove, intestine, and digestive ducts were significantly higher in oysters

exposed to *A. minutum* than in control oysters (Table 1). Only one control oyster (of 15) had hemocytes in diapedesis in the digestive tubules.

Adductor muscles of some oysters were affected by three types of myopathy as opposed to the normal pattern (Fig. 3A): myoatrophy (Fig. 3B), wavy-pattern degeneration (Fig. 3C) and hyaline degeneration (Fig. 3D). Myoatrophy was characterized by round muscle fibers surrounded by halos. Wavy-pattern degeneration was characterized by wavy and disorganized muscle fibers. Hyaline degeneration was characterized by a homogenous pink color, hyaline (no organelles are visible) and abnormal round forms of the muscle fibers. Intensities of myoatrophy and hyaline degeneration were significantly higher in oysters exposed to *A. minutum*, as compared to those fed *T.iso* (Table 1). Wavy-pattern and hyaline degeneration were not observed in any control oysters.

Although gill tissue structures were not altered, histological observations revealed higher mucus production in *A. minutum*-exposed oysters (Fig. 4) in relation to controls. Mucus production in gills of *A. minutum*-exposed oysters was significantly more intense than in the control oysters (Table 1).

### 3.1.3. Pathological conditions: general status

The total number of pathological conditions observed in the digestive gland was significantly higher ( $p < 0.001$ ;  $n = 15$ ;  $t$ -test) in the oysters exposed to *A. minutum* ( $6.2 \pm 0.8$ ) in comparison to oysters fed *T.iso* ( $3.1 \pm 0.7$ ). There were also significantly more

Table 1

Effects of microalgal exposure on the intensity of pathological changes in oyster digestive gland, gills and muscle. Results are expressed as mean of stage intensity  $\pm$  CI ( $n = 15$ ), with stage 0 = absence or very light, stage 1 = moderate and stage 2 = heavy.

Organ	Variable	Mean $\pm$ CI		U-test
		<i>A. minutum</i>	<i>T.iso</i>	
Digestive gland				
Hemocytes surrounding	Intestinal groove	1.07 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.2	**
	Intestine	1.4 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	**
	Digestive ducts	0.9 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	NS
	Digestive tubules	0.5 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.3	NS
Hemocytes in diapedesis	Intestinal groove	1.2 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.3	***
	Intestine	1.4 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3	***
	Digestive ducts	0.7 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.3	*
	Digestive tubules	0.3 $\pm$ 0.3	0.06 $\pm$ 0.1	NS
Gills	Presence of mucus	0.9 $\pm$ 0.4	0.1 $\pm$ 0.2	**
Adductor muscle	Myoatrophy	1.1 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.3	**
	Hyaline degeneration	0.6 $\pm$ 0.3	0	**
	Wavy pattern degeneration	0.3 $\pm$ 0.2	0	NS

NS: non-significant.

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.01$ .

\*\*\*  $p < 0.001$ .

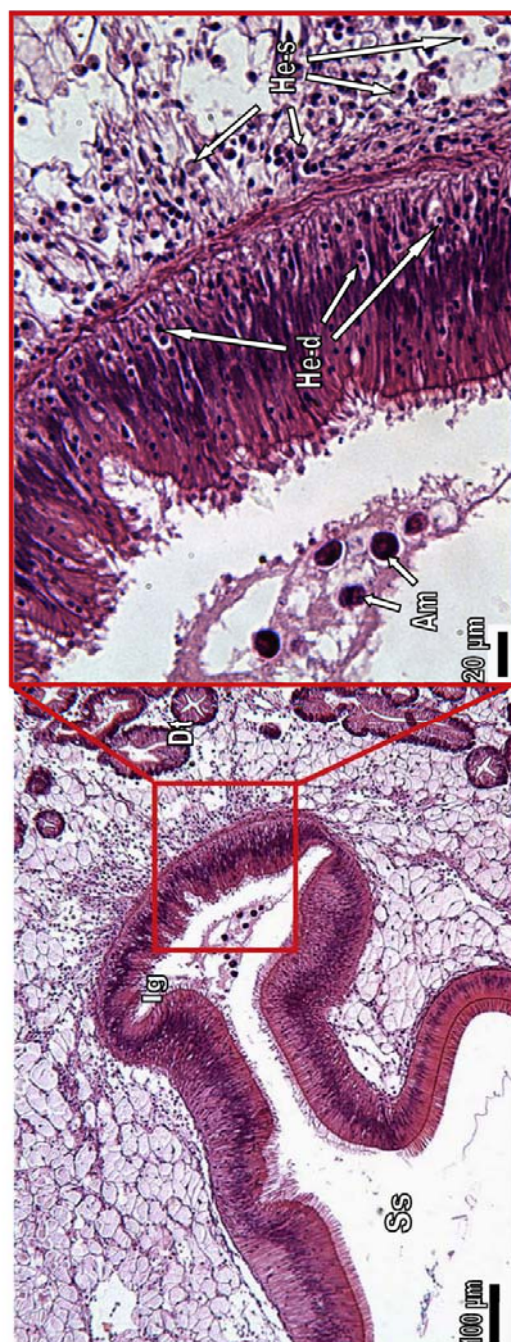


Fig. 2. Light inflammatory condition of the intestinal groove presented as aggregation of hemocytes in the connective tissue and diapedesis through intestine epithelium. Hematoxylin-eosin stained paraffin sections. Style sac (Ss), intestine groove (Ig) and digestive tubules (Dt) of *C. gigas*. *A. minutum* cells (Am), surrounding hemocytes (He-s) and hemocytes in diapedesis (He-d).

pathological abnormalities in the muscle ( $p < 0.01$ ;  $n = 15$ ;  $t$ -test) in oysters exposed to *A. minutum* ( $1.6 \pm 0.6$ ) than in oysters fed T.Iso ( $0.4 \pm 0.3$ ).

### 3.2. Wet weight of digestive gland and condition index

Condition index did not significantly vary ( $p > 0.05$ ,  $n = 12$ ,  $t$ -test) between oysters exposed to *A. minutum* or T.Iso, being  $6.1 \pm 0.9$  and  $5.8 \pm 1.4$ , respectively. Body dry weight did not significantly vary ( $p > 0.05$ ,  $n = 12$ ,  $t$ -test) between oysters exposed to *A. minutum* or T.Iso, being  $0.6 \pm 0.1$  and  $0.5 \pm 0.1$  g, respectively.

### 3.3. Toxin content

PST content in digestive glands of exposed oysters (*A. minutum*) was  $145.5 \pm 3.3$   $\mu\text{g}$  STX equiv.  $100\text{ g}^{-1}$  of digestive gland wet weight. No PSTs were detected in any pool of digestive glands from control oysters (fed T.Iso).

### 3.4. Digestive-gland variables

There was no variation of total neutral lipid contents in digestive glands of oysters regardless of experimental treatment (Fig. 5). Phospholipid contents decreased significantly in digestive glands of oysters exposed to *A. minutum* in comparison to those fed T.Iso (Fig. 5).

#### 3.4.1. Neutral lipid contents

Neutral lipid classes detected in digestive glands were free fatty acids, sterol esters, ether glycerides, sterols, monoacylglycerols, diacylglycerols and triacylglycerols (Fig. 6).

Monoacylglycerol and diacylglycerol contents were significantly lower ( $p = 0.009$  and  $p = 0.0005$ , respectively;  $t$ -test) in oysters exposed to *A. minutum* as compared to those fed T.Iso (Fig. 6).

Contents of sterols and sterol esters were significantly higher ( $p = 0.0016$  and  $p = 0.0307$ , respectively;  $t$ -test) in oysters exposed to *A. minutum* as compared to those fed T.Iso (Fig. 6).

#### 3.4.2. Polar lipid contents

Polar lipid classes detected in digestive glands were lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol + ceramide aminoethylphosphonate (PI + CAEP), phosphatidylserine (PS) and cardiolipin (CL) (Fig. 7).

CL and PS were significantly higher ( $p = 0.003$  and  $p = 0.0002$ , respectively;  $t$ -test) in oysters exposed to *A. minutum* as compared to those fed T.Iso (Fig. 7). Exposure to *A. minutum* resulted in significant decreases in PC, LPC, PE and PI + CAEP ( $p = 0.0002$ ,  $p = 0.014$ ,  $p = 0.0426$  and  $p = 0.0344$ , respectively;  $t$ -test) in relation to controls (Fig. 7).

#### 3.4.3. Amylase-specific activity

There was no significant variation in digestive-gland wet weight, protein content and amylase-specific activity in digestive gland between different microalgal exposures (Table 2).

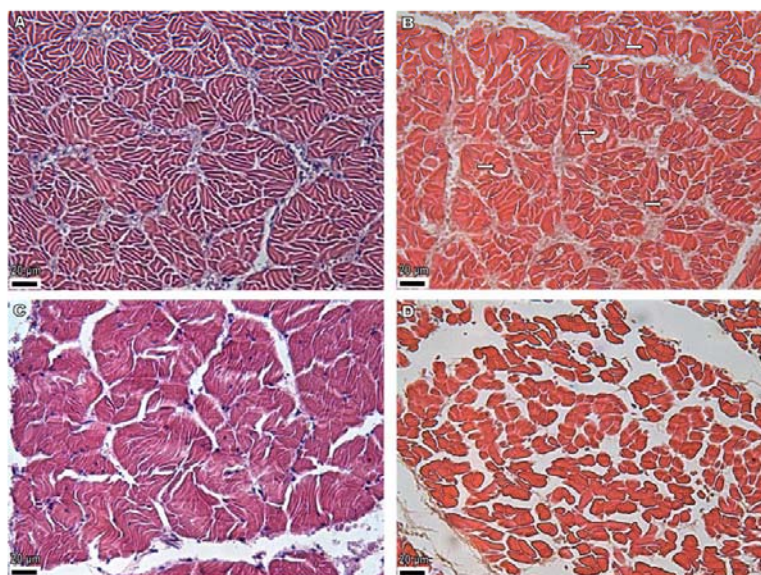
Table 2

Effects of microalgal exposure on the wet weight of digestive glands, protein content and amylase specific activity. Results are expressed as mean  $\pm$  CI ( $n = 3$ ).

Variables	Mean $\pm$ CI		t-Test
	<i>A. minutum</i>	T.Iso	
Digestive gland wet weight (g)	$0.24 \pm 0.03$	$0.24 \pm 0.03$	NS
Protein content ( $\text{mg g}^{-1}$ DG WW)	$42.4 \pm 6.4$	$41.5 \pm 3.3$	NS
Amylase specific activity	$0.6 \pm 0.03$	$0.6 \pm 0.1$	NS

NS: non-significant differences





**Fig. 3.** Different levels/types of myopathy (myodegeneration) observed in muscle of *C. gigas* exposed to *A. minutum*. Hematoxylin-eosin stained paraffin sections (scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ). (A) Healthy muscle fibers in a control oyster; (B) myoatrophy with atrophic muscle fibers (arrows); (C) wavy pattern degeneration; (D) myoatrophy with hyaline degeneration.

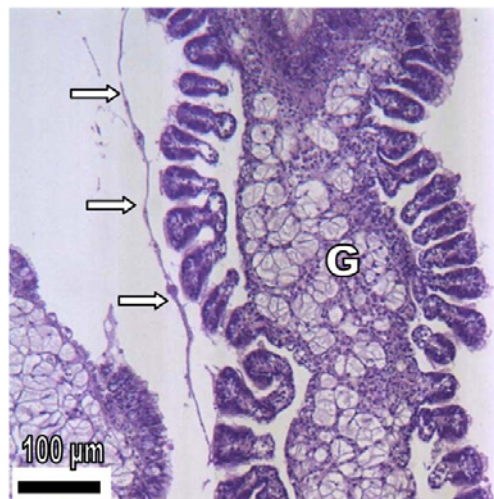
### 3.5. Spermatozoa variables

Motility and ATP content of spermatozoa extracted from *A. minutum*-exposed oysters were significantly lower ( $p = 0.0161$  and  $p = 0.0253$ , respectively;  $t$ -test) in relation to controls (Fig. 8A and B). Three control oysters produced spermatozoa characterized by high motility and high ATP content. No *A. minutum*-exposed oysters produced spermatozoa with such high motility and ATP.

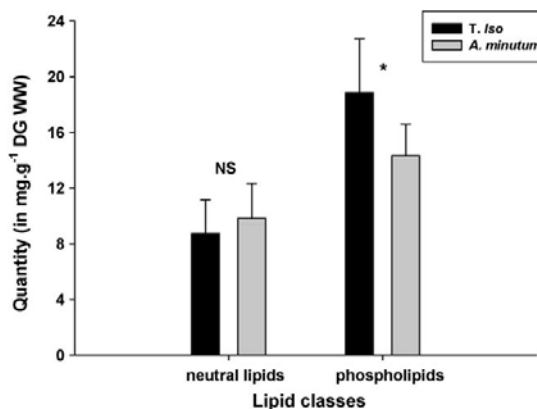
Sybr green I fluorescence intensity (related to DNA content and/or conformation) of stained, viable spermatozoa was significantly lower and much more variable in oysters exposed to *A. minutum* than in those fed *T. Iso* ( $p = 0.031$  and  $p = 0.048$ ,  $U$ -test and

Kolmogorov-Smirnov test, respectively, Fig. 8C). Side Scatter of viable spermatozoa (data not shown) of *A. minutum*-exposed oysters was significantly higher in relation to controls ( $p = 0.014$ ,  $t$ -test). The mean percentage of dead spermatozoa was significantly lower ( $p = 0.0039$ ,  $t$ -test, Fig. 8D) in oysters exposed to *A. minutum* in relation to those fed *T. Iso*.

The mitochondrial membrane potential of spermatozoa was measured using the lipophilic cation JC-1. Fluorescence intensities of JC-1 monomers and aggregates were quantified, respectively, by FL1 and FL2 detectors of the flow cytometer. The JC-1 aggregate/monomer ratio (an estimation of mitochondrial membrane potential) was not significantly different between experimental treatments (Fig. 8E). JC-1 monomer fluorescence intensity (an estimation of total JC-1 incorporation), however, was significantly higher in spermatozoa of oysters exposed to *A. minutum* than to



**Fig. 4.** Gills (G) of *A. minutum* exposed oyster. Mucus (arrows) produced by gills. Hematoxylin-eosin stained paraffin sections (scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ).



**Fig. 5.** Neutral lipid and phospholipid contents (mean of 3 pools of 10 oysters each, expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  of tissue wet weight,  $\pm\text{CI}$ ) in oyster digestive gland according to microalgal exposure. \* indicates statistically significant difference between experimental treatments; NS indicates statistically non-significant difference ( $t$ -test).

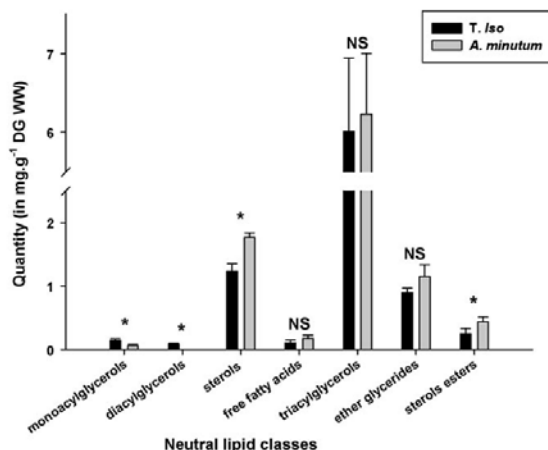


Fig. 6. Monoacylglycerol, diacylglycerol, sterol, free fatty acid, triacylglycerol, ether glycerid and sterol ester contents (mean of 3 pools of 10 oysters each, expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  of tissue wet weight,  $\pm$ CI) in oyster digestive glands according to microalgal exposure. \* indicates statistically significant difference between experimental treatments; NS indicates statistically non-significant difference (*t*-test).

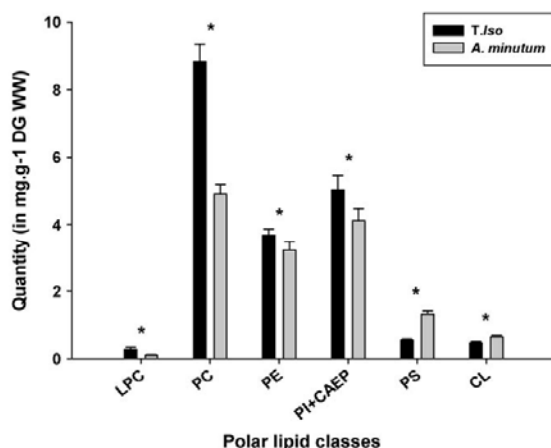


Fig. 7. Lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol + ceramide aminoethylphosphonate (PI + CAEP), phosphatidylserine (PS) and cardiolipin (CL) contents (mean of 3 pools of 10 oysters each, expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  of tissue wet weight,  $\pm$ CI) in oyster digestive glands according to microalgal exposure. \* indicates statistically significant difference between experimental treatments (*t*-test).

those of oysters fed T.Iso ( $p = 0.0007$ , *t*-test, Fig. 8F). Similarly, JC-1 aggregate fluorescence intensity (data not shown) was significantly higher in spermatozoa of oysters exposed to *A. minutum* compared to controls.

#### 4. Discussion

Comparison of *A. minutum*-exposed oysters with controls feeding on a microalga known to be nutritious, T.Iso, was contingent upon confirmation that oysters were actively feeding on and ingesting both microalga. All oysters (of both diets) observed by histology were actively digesting microalga ingested, based upon the star-shape of lumina in digestive tubules (this reveals that tubules are actively absorbing). This indicates that the

oysters can at least partially digest *A. minutum* cells, despite potential toxicity. Nevertheless, presence of both intact cells and temporary cysts in the digestive system (intestine groove and intestine) and feces (data not shown) of oysters exposed to *A. minutum* suggests that the oysters were unable to completely digest all ingested cells of this species. Presence of intact, harmful-algal cells in the digestive system of exposed bivalves has already been observed by Galimany et al. (2008a,c). Hégaret et al. (2007, 2008a) reported presence of intact *Alexandrium* cells and temporary cysts in bivalve feces. Persson et al. (2006) also observed temporary cysts of *A. fundyense* in feces of oysters feeding on vegetative cells. *A. minutum* may prevent digestion by forming cysts.

In a previous study, paralysis of adductor muscles of *C. virginica* was one visible effect observed upon *A. fundyense* exposure (Hégaret et al., 2007). Recently, Tran et al. (2010) reported behavior changes in *C. gigas* upon exposure to *A. minutum*, e.g., increases in valve-opening duration and number of abnormal micro-closures. The latter is possibly related to dysfunction of adductor muscle. Moreover, although mechanisms remained unclear, adductor muscles of *R. philippinarum* were shown to be altered after exposure to *Prorocentrum minimum* (Hégaret et al., 2009). In accordance with the above-cited studies, adductor muscles of *A. minutum*-exposed oysters in the present study were intensely affected by myopathy: myoatrophy, hyaline degeneration and wavy-pattern degeneration. Such changes of muscle tissue structure may be associated with the muscle paralysis observed during *Alexandrium* exposure in *C. virginica* and *M. edulis* (Hégaret et al., 2007; Galimany et al., 2008a). Observed myodegeneration may partially explain the modifications in valve activity of oysters exposed to *A. minutum* (Tran et al., 2010). Such modifications of muscle structure and activity can possibly affect oyster respiration and nutrition processes, as adductor muscle contraction contributes to maintenance of optimal amplitude of valve opening (Frank et al., 2007). The gill, however, remains the most important organ regarding respiration and feeding, and thus, this organ is expected to be the first in contact with toxic or non-toxic phytoplankton cells. Histological observations revealed that gills were affected by *A. minutum* exposure. Significantly increased mucus production was observed in *A. minutum*-exposed oysters in relation to controls. Shumway and Cucci (1987) showed that some bivalves (*M. edulis*, *Placopecten magellanicus*, and *Geukensia demissa*) increased mucus production after exposure to *Protogonyaulax tamarens* (= *Alexandrium tamarens*), probably to avoid consumption of toxic cells. Mucus associated with gills also contains powerful lytic enzymes that act against a variety of stressors and play an important role in defense (Fisher, 1992; Brun et al., 2000).

This reaction to harmful and/or toxic microalgal exposure was also noted in finfish. Excess mucus production in gills of brown trout (*Salmo trutta*) exposed to a cyanobacterial (blue-green algal) bloom was suggested to be related to acute irritation (high pH, physical irritation caused by high bloom density, a direct, toxic effect of toxins, or a combination of all of these factors) (Rodger et al., 1994). Exposure to *Cochlodinium polykrikoides* also resulted in increases of mucus production by gills in several fish species (Kim et al., 2000). It is thought that increased mucus production by oyster gills probably reflects tissue irritation and/or defense reaction to *A. minutum* cells and/or extra-cellular, bioactive compounds.

In the present study, inflammatory responses, in the form of aggregations of hemocytes and massive migration of hemocytes through the epithelia by diapedesis, were observed in the digestive gland and were especially prominent in oysters exposed to *A. minutum*. The digestive gland, intestinal groove, and intestine were the tissues most-affected by these inflammatory responses.



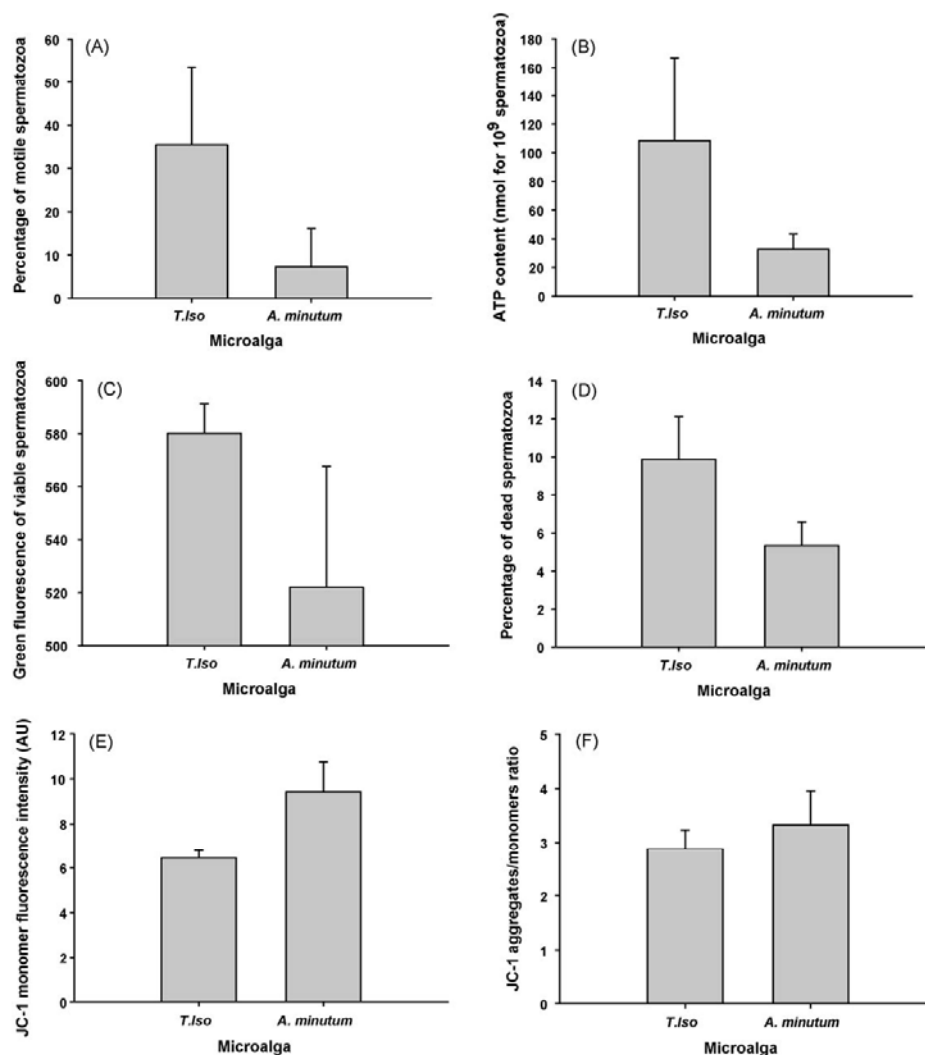


Fig. 8. Percentage of motile spermatozoa (A), ATP content (B), fluorescence intensity of SYBR Green I stained spermatozoa (C), percentage of dead spermatozoa (D), JC-1 monomer fluorescence intensity (E) and JC-1 aggregate/monomer ratio (F) of oyster spermatozoa according to microalgal exposures.

Galimany et al. (2008a,b,c) described similar, inflammatory responses (infiltration and diapedesis of hemocytes) in blue mussels (*M. edulis*) exposed to *A. fundyense*, *P. minimum* or *Karlodinium veneticum*. Hégaret et al. (2009) also observed infiltration of hemocytes into the intestine and gonad follicles of *R. philippinarum* exposed to *P. minimum*. Estrada et al. (2007) observed aggregation of hemocytes in the digestive gland, mantle, and gills of the scallop, *Nodipecten subnodosus*, exposed to the toxigenic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. Smolowitz and Shumway (1997) described inflammatory responses in different organs of several bivalve species (such as *Argopecten irradians*, *C. virginica* and *Ostrea edulis*) exposed to *Gyrodinium aureolum* (*Karenia mikimotoi*).

Three hypotheses can be formulated to explain such a response. The first involves a reaction directly against toxic microalgal presence within the lumina of the alimentary canal. Galimany et al. (2008b) suggested that massive migration of hemocytes into the

stomach and intestine was a defense response of mussels to protect tissues from exposure to *P. minimum*. Encapsulation of *P. minimum* cells by *R. philippinarum* hemocytes has been also suggested by Hégaret et al. (2009). Similarly, aggregates of *Mercenaria mercenaria* hemocytes surrounding *P. minimum* cells when exposed *in vitro* have been observed by Hégaret (2007) and Hégaret et al. (2008b). Results of the present and previous studies support the hypothesis that hemocytes migrate into the lumina of digestive organs to remove *A. minutum* cells and/or to protect tissues from toxicity. This reaction is clearly a non-specific immune response as it has been reported in different harmful algae/bivalve interactions.

In a second hypothesis, presence of bacteria in the lumina of the digestive system can also explain such inflammatory responses; hemocytes may possibly be responding to neutralize opportunistic bacterial infections advanced by exposure to toxic algae. Hégaret et al. (2009) suggested that presence of large amounts of bacteria

and hemocytes in the intestinal lumina of *R. philippinarum* reflected a failed attempt of the immune system to suppress opportunistic bacterial pathogens. Furthermore, Galimany et al. (2008b) observed that hemocytes engulfed bacteria by phagocytosis in the alimentary canal lumina of mussels exposed to *P. minimum*.

As a third hypothesis, hemocyte migration by diapedesis across intestine epithelia can be considered as a detoxification pathway (Galimany et al., 2008a). Indeed, hemocytes are suspected to carry toxins bound to lipofuchsin granules (in lysosomes), toward the alimentary canal for elimination in feces.

There was no apparent link between histological observations (massive presence of hemocytes in digestive tissues) and cell density of hemocytes circulating in the open vascular system (data not shown). Indeed, there was no significant variation of hemocyte and plasma variables according to microalgal exposure (data not shown). As hemocytes are thought to migrate from the circulatory system (hemolymph) to tissues, it is expected that the concentration of circulating hemocytes in hemolymph would decrease upon *A. minutum* exposure. Absence of such a decrease in circulating hemocytes can be interpreted as an increase in hemocyte production in response to *A. minutum* exposure compensating hemocyte migration from hemolymph toward tissues. The low percentage of dead hemocytes in hemolymph for both microalgal treatments was confirmed by the absence of necrotic and apoptotic hemocytes observed by histology.

From the histological observations in the digestive gland, it can be expected that digestion and assimilation of nutrients are likely impaired upon *A. minutum* exposure. This histological approach was further combined with a biochemical approach to determine if changes in energy-reserve contents, enzymatic activities, or structural compounds are concomitantly observed with the tissue alterations described above.

Both structural and reserve lipids were affected upon *A. minutum* exposure. Phospholipids (structural lipids), however, were the most drastically impacted by *A. minutum* exposure; the total polar lipid content decreased by 24% in digestive glands. No obvious relationship between inflammatory responses and phospholipid (PL) changes in digestive glands can be established so far. Abundance of hemocytes (mainly containing of PLs, Delaporte et al., 2003) in the digestive gland was expected to increase phospholipid content. But, the contrary was observed. Decrease of total polar lipids was mainly attributable to a two-fold decrease in PC. PC is generally considered as the "hub" in PL synthesis/remodeling and has the highest turn-over. PE, PI + CAEP and LPC also contributed to the PL decrease, but at a lesser extent. On the contrary, CL and PS, two minor PLs, increased drastically upon *A. minutum* exposure, up 38% and 134%, respectively. Such drastic changes in PL composition in the digestive gland are surprising, as PL composition is described as very stable even following marked dietary modifications (Soudant et al., 1999). Similarly, PLs showed only small variations in the digestive gland of *Pecten maximus* during an annual field survey, independently of food availability (Pazos et al., 2003).

Decrease in PL contents was unlikely to have resulted from cell lysis, as free fatty acid (FFA) content was not affected by *A. minutum* exposure. Presence of high FFA content can generally be interpreted as representing the products of cell degradation (Chu et al., 2003). Moreover, histological observations do not reveal any necrosis in digestive glands.

Coincident with the PL decrease, MAG and DAG also significantly decreased upon *A. minutum* exposure. These compounds are generally absent in gonad and muscle, and only transiently observed in digestive glands of oysters (Soudant et al., 1999). MAG and DAG are thought to be intermediate products in lipid synthesis (Larsson et al., 2006). Decrease in PC, the most drastically affected

PL by *A. minutum* exposure, may thus reflect a decrease in PL synthesis as it is coincident with DAG and MAG decreases in neutral lipids. MAG and DAG are precursors in the synthesis of several lipids, including reserve (triacylglycerol) and structural lipids (PC, PE, PI and PS) (Larsson et al., 2006). The turn-over of PLs is likely a relatively rapid phenomenon in bivalves, in light of rapid adaptation of cell membranes during temperature changes (Farias et al., 2003). Moreover, PLs show considerably less seasonal variation than neutral lipids (Pazos et al., 1996), suggesting that they are constantly synthesized and renewed. Such inhibition was observed previously in *C. virginica* exposed to PCB. Authors suggested that the observed decrease of PLs was a result of synthesis inhibition (Chu et al., 2003). Absence of decrease in TAG and ECLY contents (these lipids can be metabolized to produce MAG and DAG) suggest that oysters do not use reserve lipids to compensate for reductions in MAG and DAG, synthesis, precursors of PLs including PC, PE, PI and PS. Increases in PS and CL, when other PLs decreased, may reflect synthesis by an alternative pathway involving phosphatidic acid that does not require DAG as a precursor. To summarize, decrease in the main PL classes appeared to be related to a reduction of MAG and DAG synthesis. This reduction is possibly attributable to shortage of precursors resulting from digestion and assimilation dysfunctions, as histological observations showed major changes in tissue structure of the digestive gland upon *A. minutum* exposure.

Changes in PL composition may also reflect some changes in cell types or in organelles within cells. Indeed, PL class composition is generally found to be specific to organ tissue, cell type, or subcellular compartment (Soudant et al., 1999). Change in cell-type composition is a general phenomenon that can take place in the digestive gland epithelia of stressed mollusks as underscored by Zaldibar et al. (2008). A recent study (Zaldibar et al., 2007) demonstrated that exposure of winkles (*Littorina littorea*) to cadmium resulted in changes in the composition of the epithelia of the digestive gland (digestive ducts and tubules). These changes were characterized by a loss of digestive cells (minus 13.2%) and an increase of volume of both digestive and basophilic cells (plus 13.5% and 200%, respectively). In this study (Zaldibar et al., 2007), cell changes were relatively fast, as 20 days of cadmium exposure provoked changes, but cells returned to normal values after a 10-day depuration. Such changes in digestive and basophilic cells were not detected in our study, possibly because of the relatively short time of exposure to *A. minutum*. Although visible changes in the cells were not detectable by histology, some intra-cellular changes may have occurred causing the observed modification in PL-class composition.

Finally, lipid peroxidation could also be responsible for the PL decrease, as lipid peroxidation resulted in degradation of polyunsaturated fatty-acid composed molecules. Unfortunately, measurement of peroxidation processes could not be conducted in this experiment.

Decrease in PLs was concomitant with increase in sterol in the digestive gland. The synthesis of sterols takes a different pathway than PLs. This confirms that *A. minutum* exposure may specifically affect PL synthesis through the MAG and DAG pathway. The observed increase in sterols may somehow correspond with a compensatory response to the decrease of PLs in the digestive gland.

No variations were observed in the digestive gland wet weight, protein content, and amylase activity, suggesting that digestive-gland functions were only partially affected by *A. minutum* exposure.

Unlike the study by Hégaret et al. (2009) wherein ova degeneration was observed in *R. philippinarum* exposed to *P. minimum*, the present study did not reveal such pathology in female gonads. Despite the fact that no pathological conditions or



tissue alterations were observed in male and female oyster gonads, spermatozoa (obtained by stripping) were affected by *A. minutum* exposure.

Spermatozoa of *A. minutum*-exposed oysters showed low motility and low ATP content as compared to controls. None of the sampled oysters exposed to *A. minutum* produced spermatozoa with high motility and ATP content as seen in the control oysters, where three oysters of eight contained more than 100 nmol of ATP per 10<sup>9</sup> spermatozoa. Reduced motility resulted likely in the absence of increased ATP content, as ATP has been demonstrated to be essential for sperm motility, and decreased ATP equates with decreased sperm movement (Rurangwa et al., 2002).

Energy released by electron flow of the respiratory chain is used to pump protons across the mitochondrial inner-membrane into the inter-membrane space and generates an electrochemical gradient to drive the synthesis of ATP. The mitochondrial membrane potential resulting from this gradient is, therefore, a sensitive indicator of the energy status of the mitochondria of the cell. In the present study, this was measured using the JC-1 probe. The ratio JC-1 aggregate/monomer fluorescences (proportional to mitochondrial membrane potential) was similar in spermatozoa of control and *A. minutum*-exposed oysters. This suggests that the measured reduction in ATP content within spermatozoa did not result from an impairment of the respiratory chain function and/or of oxidative phosphorylation. Thus, the mechanisms by which *A. minutum* exposure affected ATP production by mitochondria remain yet to be elucidated.

Moreover, JC-1 monomer fluorescence intensity increased drastically in spermatozoa of *A. minutum* exposed oysters. Reers et al. (1991) stated that fluorescence of the JC-1 monomer can increase upon volume increase of mitochondria at a constant membrane potential. Mancini et al. (1997) used this variable to monitor change in mitochondrial mass. Thus, increase in incorporated JC-1 may reflect an increase in mitochondria volume, but unlikely an increase in mass, as oyster spermatozoa are believed to contain four mitochondria (Dong et al., 2005). This interpretation is supported by increases of FSC and SCC, assumed to be proportional to size and complexity respectively, in spermatozoa of *A. minutum*-exposed oysters.

Relative DNA content of spermatozoa was also estimated using fluorescence of SYBR Green I, a permeant DNA dye. SYBR Green I fluorescence (expressed in A.U.) was significantly reduced and more variable (as estimated by higher CI) in spermatozoa of *A. minutum*-exposed oysters than in control oysters. It is speculated that these changes may reflect a reduction in DNA content related to chromosome anomalies in the form of missing chromosomes or deletions.

Mortality measured in oyster spermatozoa of the present experiment was in the range found for spermatozoa of other biological models, including vertebrates (Collodel and Moretti, 2008). More surprising was the lower percentage of dead spermatozoa observed in *A. minutum*-exposed oysters in relation to controls. Although apoptosis was not formally measured here, we consider measured cell death/necrosis as the end point of apoptosis. Apoptosis is a well known way to eliminate unwanted genetic material (Singh et al., 2003). ATP synthesized by F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>-ATPase is crucial for the primary pathways of testicular-cell apoptosis (Erkkila et al., 2006). These authors demonstrated that inhibitors of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation, exposure to anoxia, and inhibition of F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>-ATPase, reduced ATP concentration and resulted thus in anti-apoptotic effect on human germ cells (Erkkila et al., 2006).

As mentioned above, we observed a reduced concentration of ATP within spermatozoa of *A. minutum*-exposed oysters. As mitochondrial membrane potential (JC-1 aggregate/monomer ratio) remained stable between treatments, the reduction in ATP

content cannot result from the inhibition of the mitochondrial respiratory chain or oxidative phosphorylation. We thus speculate that the observed ATP depletion resulted from a specific inhibition of F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>-ATPase by *A. minutum* exposure that prevented apoptosis and cell death in oyster spermatozoa as reported for human germ cells (Erkkila et al., 2006).

Alterations in gamete quality in oysters exposed to chemical pollutants were also characterized by the absence of spermatozoa motility (Nice, 2005), decrease in fertilization rate, and damage during embryonic development (Ringwood et al., 2004).

Reduced energy status and motility of spermatozoa associated to morphological changes at cellular and sub-cellular levels upon *A. minutum* exposure can be expected to have consequences to spermatozoa fertility and reproduction success. In future studies, it would be interesting to further explore subsequent impacts on larval development and spat recruitment. Direct impact on bivalve recruitment has already been observed in *A. irritans concentricus* during *Ptychodiscus brevis* (*Karenia brevis*) bloom in North Carolina (Summerson and Peterson, 1990).

## 5. Conclusion

Exposure to *A. minutum* impacted several organs and functions in *C. gigas*: gills, muscle, digestive gland, and gametes (spermatozoa). This is the first study showing that HAB exposure can affect mollusc lipid composition and metabolism. Changes in phospholipid classes in the oysters digestive gland upon *A. minutum* exposure are likely to reflect a perturbation of PL synthesis. Observed modifications of lipids, especially PLs, are more likely to result from *A. minutum* toxicity (possibly because of PSTs but not only), rather than from poor nutritional quality of this alga. For example, Fernández-Reiriz et al. (2008) demonstrated that mussels, *M. chilensis*, feeding on *A. catenella* were able to develop mechanisms which allowed exploitation of the toxic microalga as a food source (proteins, carbohydrates and lipids). To further confirm such toxic effects upon digestive-gland lipid composition, comparison of effect of PST and non-PST producing *Alexandrium* species are needed.

Exposure of oysters to *A. minutum* also resulted in activation of defense mechanisms, as shown by excess mucus production in gills and acute inflammatory responses in the digestive gland. As a link between inflammatory response and lipid peroxidation is well known in vertebrates, it appears important to further study this relationship in invertebrate models.

Despite the expectation that spermatozoa never experience direct contact with *A. minutum* cells, these cells also were affected by *A. minutum* exposure of the adult oyster. We can hypothesize that spermatozoa were mostly affected by the release of toxins upon *A. minutum* digestion.

The effects of harmful microalga on bivalve reproduction can be a considerable impediment for aquaculture and natural populations. The present study is the first to demonstrate that toxic microalga can affect "quality" of gametes issued from HAB exposed broodstock. It appears important to further evaluate the consequences, in terms of fertility, embryo and larvae output upon HAB exposure of oyster broodstock.

## Acknowledgments

We thank Patrick Lassus, Isabelle Queau, Luc Lebrun, René Robert, Jean Yves Quillay, Aimé Langlade, Edouard Bédier, Claudie Quere, Véronique Savar, Aurélie Lelong, Audrey Bruneau and Jérémy Dénès for their help conducting the experiments and their technical assistance. Sincere thanks are due to Gary H. Wikfors for English corrections. This study was carried out with the financial support of the National Research Agency (ANR), "MODECOPHY"

project 06SEST23 (2006–2009) and of the Brittany Region, "EPHYTOX" project (2006–2009).[SS]

## References

- Bardouil, M., Bohec, M., Cormerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* 12, 417–422.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 125, 359–369.
- Bricelj, V.M., Shumway, S.E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Res. Fish. Sci.* 6, 315–383.
- Brun, N.T., Ross, N.W., Boghen, A.D., 2000. Changes in electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the turbellarian *Urostoma cyprine*. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 163–170.
- Chu, F.L.E., Soudant, P., Hale, R.C., 2003. Relationship between PCB accumulation and reproductive output in conditioned oysters *Crassostrea virginica* fed a contaminated algal diet. *Aquat. Toxicol.* 65, 293–307.
- Collodel, G., Moretti, E., 2008. Morphology and meiotic segregation in spermatozoa from men of proven fertility. *J. Androl.* 29, 106–114.
- Cossarizza, A., Ceccarelli, D., Masini, A., 1996. Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level. *Exp. Cell Res.* 222, 84–94.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain, J.F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species—*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053–3064.
- Dong, Q., Huang, C., Tierscha, T.R., 2005. Spermatozoal ultrastructure of diploid and tetraploid Pacific oysters. *Aquaculture* 249, 487–496.
- Erkkila, K., Kytönen, S., Wikström, M., Taari, K., Sinha Hikim, A.P., Swerdloff, R.S., Dunkel, L., 2006. Regulation of human male germ cell death by modulators of ATP production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E1145–E1154.
- Estrada, N., de Jesus Romero, M., Campa-Cordova, A., Luna, A., Ascencio, F., 2007. Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 146, 502–510.
- Fantone, J.C., Ward, P.A., 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.* 107, 395–418.
- Farias, A., Bell, J.G., Uriarte, I., Sargent, J.R., 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. *Aquaculture* 228, 289–305.
- Fernández-Reiriz, M.J., Navarro, J.M., Contreras, A.M., Labarta, U., 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquat. Toxicol.* 87, 245–251.
- Fisher, W.S., 1992. Occurrence of agglutinins in the pallial cavity mucus of oysters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 162, 1–13.
- Frank, D.M., Hamilton, J.F., Ward, J.E., Shumway, S.E., 2007. A fiber optic sensor for high resolution measurement and continuous monitoring of valve gape in bivalve molluscs. *J. Shellfish Res.* 26, 575–580.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégarret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008a. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae* 7, 702–711.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégarret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008b. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7, 630–638.
- Galimany, E., Place, A.R., Ramon, M., Jutson, M., Pipe, R.K., 2008c. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis*. *Harmful Algae* 7, 91–98.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234–236.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E., Lassus, P., Soudant, P., in press. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.*
- Hégarret, H., 2007. Impacts of Harmful Algal Blooms on Physiological and Cellular Processes of Bivalve Molluscs. Thesis. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.
- Hégarret, H., Wikfors, G., Soudant, P., Lambert, C., Shumway, S., Bérard, J., Lassus, P., 2007. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* 152, 441–447.
- Hégarret, H., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Pate, S., Burkholder, J.M., 2008a. Potential transport of harmful algae via relocation of bivalve mollusks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 361, 169–179.
- Hégarret, H., Wikfors, G.H., Shumway, S.E., 2008b. *In vitro* interactions between several species of harmful algae and hemocytes of bivalve molluscs. In: Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark.
- Hégarret, H., da Silva, P., Sunila, I., Dixon, M.S., Alix, J., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2009. Perkinsiosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 371, 112–120.
- Ignatiades, L., Gotsis-Skretas, O., Metaxatos, A., 2007. Field and culture studies on the ecophysiology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Halim) present in Greek coastal waters. *Harmful Algae* 6, 153–165.
- Kim, C.S., Lee, S.G., Kim, H.G., 2000. Biochemical responses of fish exposed to a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254, 131–141.
- Kim, C.-J., Kim, C.-H., Sako, Y., 2005. Development of molecular identification method for genus *Alexandrium* (Dinophyceae) using whole-cell fish. *Mar. Biotechnol.* 7, 215–222.
- Larsson, K., Quinn, P., Sato, K., Tiberg, F., 2006. Lipids: structure, physical properties and functionality. *The Oily Press* 19, pp280.
- Lassus, P., Bardouil, M., Beliaeff, B., Masselin, P., Naviner, M., Truquet, P., 1999. Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim on the feeding behavior of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.* 18, 211–216.
- Le Moine, S., Sellos, D., Moal, J., Daniel, J.Y., San Juan, S.F., Samain, J.F., Van Wormhoudt, A., 1997. Amylase on *Pecten maximus* (mollusca, bivalves): protein and cDNA characterization; quantification of the expression in the digestive gland. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 6, 228–237.
- Leverone, J.R., Blake, N.J., Pierce, R.H., Shumway, S.E., 2006. Effects of the dinoflagellate *Karenia brevis* on larval development in three species of bivalve mollusc from Florida. *Toxincon* 48, 75–84.
- Li, S.C., Wang, W.X., Hsieh, D., 2001. Feeding and absorption of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by two marine bivalves from the South China Sea. *Mar. Biol.* 139, 617–624.
- Li, S.C., Wang, W.X., Hsieh, D.P.H., 2002. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Mar. Environ. Res.* 53, 145–160.
- Lilly, E.L., Halanaych, K.M., Anderson, D.M., 2005. Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the *Alexandrium minutum* group. *Harmful Algae* 4, 1004–1020.
- Lucas, A., Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44, 187–200.
- Mancini, M., Anderson, B.O., Caldwell, E., Sedghinasab, M., Paty, P.B., Hockenbery, D.M., 1997. Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J. Cell Biol.* 138, 449–469.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 59, 95–110.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., Grassé, P.P., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris, Masson. 345pp.
- Narahashi, T., 1988. Mechanism of tetrodotoxin and saxitoxin action. In: Tiu, A.T. (Ed.), *Handbook of Natural Toxins. Marine Toxins and Venoms*, 3. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 185–210.
- Navarro, J.M., Contreras, A.M., Chaparro, O.R., 2008. Short-term feeding response of the mussel *Mytilus chilensis* exposed to diets containing the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 81, 41–49.
- Nice, H.E., 2005. Sperm motility in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is affected by nonylphenol. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1668–1674.
- Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M., Yasumoto, T., 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier Science Publishers, New York, pp. 391–396.
- Oshima, Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 78, 528–532.
- Padilla, D.K., Doall, M.H., Gobler, C.J., Hartson, A., O'Boyle, K., 2006. Brown tide alga, *Aureococcus anophagefferens*, can affect growth but not survivorship of *Mercenaria mercenaria* larvae. *Harmful Algae* 5, 736–748.
- Pazos, A.J., Ruiz, C., Garcia-Martin, O., Abad, M., Sanchez, J.L., 1996. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, N.W. Spain. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 114, 171–179.
- Pazos, A.J., Sánchez, J.L., Román, G., Pérez-Parallé, M.L., Abad, M., 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 134, 367–380.
- Perchec, G., Jeulin, C., Cosson, J., André, F., Billard, R., 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *J. Cell Sci.* 108, 747–753.
- Persson, A., Smith, B.C., Wikfors, G.H., Quilliam, M., 2006. Grazing on toxic *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae* 5, 678–684.
- Ranston, E.R., Webber, D.F., Larsen, J., 2007. The first description of the potentially toxic dinoflagellate, *Alexandrium minutum* in Hunts Bay, Kingston Harbour, Jamaica. *Harmful Algae* 6, 29–47.
- Reers, M., Smith, T.W., Chen, L.B., 1991. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 30, 4480–4486.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., Robert, R., 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287, 395–401.
- Ringwood, A.H., Hoguet, J., Keppler, C., Gielazyn, M., 2004. Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters—*Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 58, 151–155.

- Rodger, H.D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated with pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. *J. Fish Dis.* 17, 177–181.
- Royer, J., Segueineau, C., Park, K.-I., Pouvreau, S., Choi, K.-S., Costil, K., 2008. Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture* 277, 313–320.
- Rurangwa, E., Bieganski, A., Slominska, E., Skorkowski, E.F., Ollevier, F., 2002. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 131, 335–344.
- Samain, J.F., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R., 1977. Trypsine, amylase et protéines du zooplancton: dosage automatique et manuel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 29, 279–289.
- Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35, 325–347.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarens* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 10, 9–27.
- Shumway, S.E., Burkholder, J.A.M., Springer, J., 2006. Effects of the estuarine dinoflagellate *Pfiesteria shumwayae* (Dinophyceae) on survival and grazing activity of several shellfish species. *Harmful Algae* 5, 442–458.
- Singh, N.P., Muller, C.H., Berger, R.E., 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil. Steril.* 80, 1420–1430.
- Smolowitz, R., Shumway, S.E., 1997. Possible cytotoxic effects of the dinoflagellate, *Gyrodinium aureolum*, on juvenile bivalve molluscs. *Aquacult. Int.* 5, 291–300.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quéré, C., Lecoz, J.R., Samain, J.F., 1996. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143, 361–378.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Massil, H., Samain, J.F., 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 121, 279–288.
- Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 123, 209–222.
- Springer, J.J., Shumway, S.E., Burkholder, J.A.M., Glasgow, H.B., 2002. Interactions between the toxic estuarine dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* and two species of bivalve mollusks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 245, 1–10.
- Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P., Massabuau, J.C., 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture* 298, 338–345.
- Wildish, D., Lassus, P., Martin, J., Saulnier, A., Bardouil, M., 1998. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp., on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 11, 35–43.
- Yan, T., Zhou, M., Fu, M., Wang, Y., Yu, R., Li, J., 2001. Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop, *Chlamys farreri*, associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarens*. *Toxicon* 39, 1239–1244.
- Yan, T., Zhou, M.J., Fu, M., Yu, R.C., Wang, Y.F., Li, J., 2003. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium tamarens* on early development of the scallop *Argopecten irradians concentricus*. *Aquaculture* 217, 167–178.
- Yurchenko, O.V., Radashevsky, V.I., Hsieh, H.L., Reunov, A.A., 2009. Ultrastructural comparison of the spermatozoa of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* inhabiting polluted and relatively clean areas in Taiwan. *Aquat. Ecol.* 43, 513–519.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Marigomez, I., 2007. Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. *Aquat. Toxicol.* 81, 183–196.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M., Marigomez, I., 2008. Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation between a relatively unpolluted and a chronically metal-polluted site. *Environ. Pollut.* 156, 367–379.

# Further reading

- Brizard, R., Bernanrdi, M., Boudry, P., Haffray, P., Labbe, C., Maisse, G., Maurouard, E., Robert, R., Roger, J.L., 2004. Projet Cryoyster: optimisation, standardisation et validation de la congélation de la laitance d'huître creuse *Crassostrea gigas* à des fins de conservation et de diffusion génétique. Rapport final OFIMER (03/5 210 093), 36pp.
- Grizel, H., Auffret, M., 2003. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Editions Quae. 201 p.
- Hoagland, P., Anderson, D.M., Kaoru, Y., White, A.W., 2002. The economic effects of harmful algal blooms in the United States: estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries* 25, 819–837.
- Hoagland, P., Scatista, S., 2006. The economic effects of harmful algal blooms. In: Graneli, E., Turner, J. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Ecology Studies Series. Springer-Verlag, Dordrecht, The Netherlands, pp. 391–402.
- Landsberg, J.H., 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Fish. Sci.* 10, 113–390.





### 3.4. Synthèse

Les objectifs du premier article présenté ici étaient d'évaluer : 1) l'impact de l'exposition des huîtres à *A. minutum* au niveau de la glande digestive et du système immunitaire ; 2) en quoi le stade de maturité et/ou la ploïdie peuvent moduler l'impact d' *A. minutum* sur *C. gigas*. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence que les huîtres triploïdes accumulent deux fois plus de PSTs que les diploïdes lorsqu'elles sont exposées à *A. minutum* dans des conditions identiques. Cette différence d'accumulation pourrait être liée à une moindre sensibilité des triploïdes vis-à-vis des PSTs, mais aussi à un métabolisme plus actif. L'exposition provoque également une modification du contenu en lipides de réserve de la glande digestive. Ces résultats suggèrent que l'exposition à *A. minutum* perturbe le fonctionnement de la glande digestive, comme cela pourrait être le cas de la synthèse des lipides. Enfin, *A. minutum* induit une modulation des paramètres hématocytaires de *C. gigas*, dont les variations dépendent de la ploïdie, du stade de maturité et de l'état physiologique des huîtres.

Les analyses supplémentaires exposées dans le second article, ont concerné la quantification des lipides membranaires de la glande digestive, des observations microscopiques de différents organes et tissus, de même que la qualité des spermatozoïdes produits par les huîtres exposées à *A. minutum*. Cela nous a permis de confirmer une modification du contenu en lipides de réserve de la glande digestive d'huîtres, mais aussi de mettre en évidence une modification des quantités de lipides membranaires dans cet organe. Ces résultats vont dans le sens d'une modification fonctionnelle et structurale de la glande digestive des huîtres exposées à *A. minutum*. Bien que les paramètres hématocytaires n'aient pas présenté de variations, comme c'était le cas lors de la première série d'expérimentations, une importante réaction inflammatoire a été observée dans la glande digestive des huîtres exposées à *A. minutum*. Cette réaction évoque une stimulation du système immunitaire liée à l'exposition à la micro-algue toxique. Enfin, l'exposition de *C. gigas* induit une dégradation de la qualité des spermatozoïdes produits, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la reproduction.

Les résultats obtenus lors des différentes expérimentations d'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* soulignent que cette micro-algue toxique peut affecter différentes fonctions, organes et cellules des huîtres. L'approche intégrative mise en place au cours de ces travaux devrait permettre d'établir des liens entre les différents aspects de la physiologie de l'huître affectés par l'exposition à *A. minutum*.



---

## **Chapitre 4 – Synthèse générale**

---



# 1. Importance de l'état physiologique d'*A. minutum* dans les interactions

Le statut physiologique des micro-algues toxiques peut avoir une incidence sur leurs interactions avec les bivalves. Plus particulièrement, la capacité pour certaines espèces de dinoflagellés à former des kystes temporaires, comme c'est le cas pour *A. minutum*, peut avoir une influence importante.

Dans le présent travail, l'état physiologique de *A. minutum* a été déterminé en utilisant la cytométrie en flux couplée à des marqueurs fluorescents et des observations microscopiques. Cela a permis de démontrer que **l'utilisation de certains systèmes expérimentaux ou la manipulation des cultures peuvent aboutir à la formation de kystes temporaires par *A. minutum***. Par exemple, la centrifugation (3x10 min 782 g), qui peut être utilisée pour rincer ou concentrer les micro-algues, provoque l'enkystement de la totalité des cellules d'*A. minutum*. De même, l'utilisation d'une pompe pour homogénéiser l'eau d'un système expérimental contenant des bivalves, induit la formation de kystes en nombre supérieur à l'utilisation d'un système d'homogénéisation par bullage. Ce constat pourrait sans doute s'appliquer aux systèmes expérimentaux en circuit fermé, utilisant une pompe pour recirculer la masse d'eau et maintenir les micro-algues en suspension.

La formation des kystes temporaires par les dinoflagellés se traduit entre autres par la perte de leurs flagelles et donc leur mobilité. Dans le cas d'un système expérimental, cela a pour conséquence une sédimentation rapide des cellules qui, n'étant plus en suspension dans la colonne d'eau, ne seraient donc plus accessibles pour l'ingestion par des bivalves suspensivores. Ensuite, la paroi (pellicule) synthétisée par les dinoflagellés, lors de la formation des kystes temporaires, est imperméable (exclusion du SYBR-Green I, cf article 1) et présente une forte résistance aux attaques chimiques (Morrill and Loeblich, 1981). Cette pellicule semble permettre aux dinoflagellés de mieux résister à la digestion par les bivalves. Ainsi, Persson et al. (2006) ont observé que 28% des cellules végétatives d'*A. fundyense* ingérées par *C. virginica* résistent à la digestion en formant des kystes temporaires. Des kystes temporaires d'*A. minutum* ont également été observés dans le tractus digestif de l'huître creuse, *C. gigas* (Laabir and Gentien, 1999 ; Laabir et al., 2007 ; cf article 5).

Les contenus intracellulaires (nutriments, toxines...) des dinoflagellés transformés en kystes ne sont alors probablement plus disponibles pour les bivalves. **La formation de kystes temporaires doit donc être prise en compte en termes de précautions lors de la manipulation des micro-algues ou de la conception des systèmes expérimentaux.** Il serait par ailleurs intéressant de comparer le contenu toxinique (quantité et profil) des cellules végétatives et des kystes temporaires d'*A. minutum*. Par la suite, dans le cas où une différence de contenu en PSTs serait établie, des expositions de bivalves à des kystes temporaires d'*A. minutum* pourraient être envisagées et comparées à celles faites avec des cellules en stade végétatif.





## 2. Implication de l'état physiologique de l'huître dans l'accumulation de PSTs

L'enregistrement de l'activité valvaire des huîtres exposées à *A. minutum* a permis de faire un lien entre l'accumulation de toxines et le comportement : **plus les huîtres ont un temps important, plus elles accumulent de PSTs**. Cela suggère que plus une huître est ouverte (en termes de durée), plus elle ingère de micro-algues et plus elle accumule de toxines. Une précédente étude conforte cette hypothèse : Bougrier et al. (2003) avaient mis en évidence une corrélation positive entre la durée de l'activité de nutrition et la quantité de PSTs mesurées dans les tissus de *C. gigas* exposées à *A. minutum*. De fortes différences inter-individuelles d'accumulation de toxines avaient également été observées lors d'études plus récentes (Lassus et al., 2004 ; 2007).

**Les huîtres qui accumulent le plus de toxines sont aussi celles qui modifient le plus leur comportement lors de l'exposition à *A. minutum***, par rapport à leur comportement avant exposition (voir article 3). L'existence d'une variabilité inter-individuelle de sensibilité des huîtres vis-à-vis d'*A. minutum* et/ou de ses toxines pourrait aider à expliquer ce phénomène. En effet, les individus qui augmentent leur temps et leur amplitude d'ouverture s'exposent d'avantage aux micro-algues toxiques que ceux qui ne modifient pas ou peu leur comportement. Ils seraient donc moins sensibles à la toxicité des micro-algues et ne mettraient pas en place des mécanismes leur permettant de minimiser le contact. De telles différences de sensibilité aux PSTs ont été décrites dans la littérature entre différentes espèces de bivalves (Bricelj et Shumway, 1998) mais aussi entre individus d'une même espèce mais provenant de différents sites (Bricelj et al. 2005). Bricelj et al. (2005) ont exposé des myes (*Mya arenaria*) provenant de deux populations différentes à *A. tamarensis*, dans des conditions identiques. Les individus de l'une de ces populations présentaient une mutation les rendant moins sensibles aux PSTs (diminution d'un facteur 1000 de l'affinité de la saxitoxine pour les sites actifs des pompes à sodium des cellules nerveuses). En parallèle, ces mêmes individus présentaient une accumulation en toxines quatre fois supérieure à celle des individus sensibles (provenant de la seconde population et ne présentant pas de mutation). Lors des expositions de *C. gigas* à *A. minutum* réalisées au cours de ce travail de thèse, **de fortes variations individuelles d'accumulation des PSTs par les huîtres ont été observées, pouvant atteindre un facteur 80** entre deux huîtres placées dans les mêmes conditions d'exposition.

**Les résultats de la présente étude tendent à montrer l'existence d'une différence de sensibilité vis-à-vis des PSTs entre des huîtres appartenant à une même population.**

*Il serait donc intéressant de tenter d'établir un parallèle entre la sensibilité des pompes à sodium de cellules nerveuses et la modification, plus ou moins prononcée, de l'activité valvaire des huîtres.*

Une telle différence de sensibilité pourrait également expliquer l'écart important entre les quantités de PSTs accumulées par les huîtres diploïdes et triploïdes exposées à *A. minutum*. En effet, lorsqu'elles sont exposées à *A. minutum* dans des conditions identiques, **les huîtres triploïdes accumulent deux fois plus de PSTs dans leur glande digestive que les huîtres**

**diploïdes** (ces résultats ont été observés aux cours de quatre expérimentations réalisées en avril et mai 2007 – voir article 1 – et en mai et juin 2008 - les résultats ne sont pas présentés ici). Les huîtres triploïdes seraient moins « incommodées » par la présence d'*A. minutum*, ingéreraient plus de cellules toxiques et donc accumuleraient plus de toxines. Néanmoins, la différence d'accumulation de PSTs entre les huîtres diploïdes et triploïdes peut également s'expliquer par des différences d'activités physiologiques entre les huîtres triploïdes et diploïdes en période de reproduction active. À la période durant laquelle les expérimentations ont été réalisées (avril-mai-juin), **les huîtres triploïdes présentent un métabolisme (oxydatif notamment) plus actif que les diploïdes**. L'effort de reproduction étant moindre chez les triploïdes, elles investiraient moins d'énergie dans la production de gamètes, et auraient donc plus d'énergie pour d'autres fonctions métaboliques, telles que la nutrition ou la croissance (Nell, 2002). Toutefois il faut rappeler que les différences physiologiques observées entre les diploïdes et les triploïdes pourraient aussi s'expliquer par leurs patrimoines génétiques respectifs. L'augmentation du matériel génétique et du nombre de copies des gènes chez les triploïdes pourraient avoir des implications en terme de physiologie, en ayant des effets additifs et non-additifs sur l'expression de certains gènes (Riddle et al., 2006; Johnson et al., 2007).

*Au vu de ces résultats, il serait particulièrement pertinent de comparer l'activité valvaire des huîtres diploïdes et triploïdes en présence de micro-algues toxiques pendant la période de reproduction.*

En ce qui concerne la biotransformation des toxines, **la présente étude a permis d'établir une relation négative entre la quantité de PSTs accumulée et la biotransformation de ces toxines par les huîtres** (pour plus de détails concernant l'évaluation de la biotransformation des PSTs, se référer à la partie 2.3). Cette relation a été établie grâce aux mesures faites au niveau individuel (article 3). Cette relation a aussi été observée lors des expérimentations d'exposition des huîtres diploïdes et triploïdes. Ces dernières accumulaient plus de toxines que les diploïdes, mais bio-transformaient moins les PSTs accumulées (données non présentées). Au final, plus les huîtres accumulent de PSTs, moins celles-ci sont bio-transformées. Les capacités de biotransformation des huîtres semblent être donc limitées, probablement par des mécanismes de saturation.

*En résumé, plus les huîtres sont actives (aussi bien en termes de comportement que de métabolisme) et moins sensibles aux PSTs, plus elles accumuleraient de toxines. Si cette hypothèse se confirmait, cela pourrait avoir des conséquences notamment en termes de production et de gestion des huîtres triploïdes. Il serait d'ailleurs pertinent d'explorer comment des huîtres sélectionnées pour leur résistance aux mortalités estivales se comportent pour l'accumulation de PSTs.*

### 3. Réponses biologiques et physiologiques de *C. gigas* à l'exposition à *A. minutum*.

Comme cela a été évoqué précédemment, *A. minutum* produit des molécules toxiques, autres que les PSTs, qui sont susceptibles d'avoir des effets négatifs sur certains organismes. Il est donc difficile de déterminer quelles molécules toxiques sont responsables des effets observés au cours de la présente étude. De ce fait, la quantification des PSTs accumulées par *C. gigas* pourrait aussi être utilisée comme un marqueur d'interaction avec *A. minutum*, et pas uniquement comme le principal facteur directement responsable des variations des paramètres physiologiques des huîtres. Il est donc préférable de parler de réponses biologiques ou physiologiques à l'exposition à la micro-algue toxique (ici *A. minutum*) plutôt que de l'impact de la toxine connue (généralement associée à des symptômes chez l'Homme).

**L'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* provoque aussi bien des réponses externes (comportement) que des réponses internes (tissulaires, cellulaires ou métaboliques).**

L'augmentation de la fréquence des micro-fermetures observée chez *C. gigas* exposée à *A. minutum* peut être interprétée comme une réaction favorisant l'expulsion des cellules toxiques hors de la cavité palléale. De plus, l'augmentation de la production de mucus par les branchies est supposée favoriser l'agglutination des cellules algales et donc leur expulsion sous forme de pseudo-fèces. Ce phénomène peut aussi être interprété comme le signe d'une irritation des ces organes fragiles. La production de composés hémolytiques par *A. minutum* (Arzul et al., 1999) pourrait être à l'origine de cette irritation. Des altérations des fibres musculaires (atrophie, dégénérescence en forme de vagues, dégénérescence hyaline) ont également été observées au niveau du muscle adducteur des huîtres exposées à *A. minutum*. Ces altérations musculaires peuvent aussi expliquer la modification de l'activité valvaire des huîtres mais cela reste à établir. L'exposition de *C. virginica* à *A. fundyense* peut aussi conduire à la paralysie du muscle adducteur Hégaret et al. (2007a) suggérant dans ce cas un effet direct des PSTs sur le muscle.

**Les cellules d'*A. minutum* ingérées par *C. gigas* provoquent, chez certains individus, une forte réaction inflammatoire dans la glande digestive.** Cette réaction se caractérise par une agglutination massive d'hémocytes autour de différents organes et tissus de la glande digestive : l'estomac, l'intestin ainsi que les conduits et tubules digestifs. Des hémocytes en diapédèse au niveau des épithéliums de ces mêmes organes ont également été observés. La présence de débris cellulaires et de kystes temporaires d'*A. minutum* dans la glande digestive peut en partie expliquer cette réaction inflammatoire. En effet, les hémocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire des bivalves face aux pathogènes et aux polluants (Chu et Lapeyre, 1993 ; Ford et al., 1993 ; Fisher et al., 2000). **La réaction inflammatoire observée ici irait donc plutôt dans le sens d'une activation du système immunitaire des huîtres creuses, *C. gigas*, lorsque celles-ci sont exposées à *A. minutum*.**

En parallèle de cette réaction inflammatoire, les paramètres hématologiques et hémolymphatiques de *C. gigas* ont présenté des variations, bien que modestes, à la suite de l'exposition à *A. minutum*. En effet, comme l'ont précédemment observé Hégaret et al.

(2007a) chez *C. gigas* et *C. virginica* exposées respectivement à *A. catenella* et *A. fundyense*, l'intensité des variations des paramètres hématocytaires de *C. gigas* après exposition à *A. minutum* reste faible. D'une façon générale, les hématocytes circulants semblent particulièrement « résistants » à l'exposition aux algues toxiques, que les interactions soient conduites *in vivo* ou *in vitro* (Hégaret, 2007 ; articles 4 et 5). Il semble aussi que ces hématocytes circulants soient particulièrement bien renouvelés dans l'hémolymph des bivalves. Cela suggère leur rôle clef dans l'homéostasie des bivalves et pourrait de ce fait justifier leur résistance aux stress biotiques et abiotiques (Donaghy et al., 2009).

Les variations des paramètres hématocytaires mesurés au cours de la présente étude paraissent pour certaines liées à la quantité de PSTs accumulées par les huîtres. La concentration totale en hématocytes, l'activité de la phénoloxylase des hématocytes et la production d'espèces réactives de l'oxygène par les granulocytes et les hyalinocytes augmentent de façon parallèle aux quantités de PSTs accumulées par *C. gigas*. Néanmoins, comme mentionné précédemment, les relations causales entre la présence de PSTs dans les tissus de *C. gigas* et les variations des paramètres hématocytaires observées suite à une exposition à *A. minutum* ne sont pas toujours évidentes.

*Les mesures d'activités valvaires évaluant le temps et l'amplitude d'ouverture des huîtres pourraient alors suffire à mettre en évidence d'éventuels liens entre l'exposition « réelle » des huîtres à *A. minutum* et les variations des paramètres cellulaires mesurés. Il pourrait aussi être intéressant d'explorer la possibilité d'un lien entre l'intensité de la réaction inflammatoire et les variations des paramètres hématocytaires en procédant à des observations et des mesures sur un même individu.*

Au-delà de la réaction inflammatoire observée dans la glande digestive, les lipides structuraux et les lipides de réserves sont aussi modifiés dans les glandes digestives des huîtres exposées à *A. minutum*. La variation la plus importante est la diminution de la quantité de lipides structuraux (phospholipides), essentiellement liée à la diminution de la quantité de phosphatidylcholine. Ces variations pourraient être liées, soit à une **perturbation de la synthèse même des phospholipides, soit à une modification des compositions cellulaires et sub-cellulaires de cet organe**. L'impact des micro-algues toxiques sur le métabolisme et/ou la composition lipidique des huîtres mérite d'être confirmé et approfondi, du fait de leur rôle clef dans le développement et la reproduction des bivalves (Soudant et al. 1999).

*L'étude de la composition en acides gras des lipides structuraux et de réserve pourrait s'avérer être une piste intéressante, d'abord pour mieux caractériser les modifications du métabolisme lipidique induites par l'exposition à *A. minutum*, mais aussi comme traceurs de l'exposition à des dinoflagellés tels qu'*A. minutum* qui possèdent des acides gras poly-insaturés caractéristiques. L'évaluation de la peroxydation des lipides pourrait probablement être un bon indicateur de l'impact de la micro-algue toxique.*

L'impact de l'exposition à *A. minutum* a également été évalué au niveau des gamètes mâles produits par les huîtres exposées à cette micro-algue. **L'exposition des géniteurs mâles de *C. gigas* à *A. minutum* entraîne une diminution de la mobilité des spermatozoïdes et de leur contenu en ATP par rapport à des géniteurs nourris avec T -Iso.** Les résultats obtenus

semblent également indiquer une altération de la structure du noyau ainsi qu'une modification de l'activité mitochondriale. On peut supposer que ces modifications peuvent avoir des effets sur la fertilité des spermatozoïdes et compromettre le succès reproductif des huîtres. Frangopulos et al. (2000) ont par exemple observé une diminution du taux d'éclosion des œufs du copépode, *Acartia clausi*, suite à l'exposition des géniteurs à *A. minutum*.

*Des expérimentations de fécondation in vitro après exposition de géniteurs mâles à A. minutum pourraient permettre de tester cette hypothèse. Il serait aussi intéressant d'évaluer la qualité des ovocytes produits par les huîtres selon le même type d'approche. À plus long terme, la qualité des larves et des juvéniles (dans le cas d'une fécondation réussie) pourrait aussi être évaluée. De même, une recherche d'effets trans-générationnels pourrait être réalisée. Dans un contexte différent, Nice et al., (2005) ont observé des effets trans-générationnels chez C. gigas exposée à du nonylphenol. Les auteurs ont observé un taux de survie plus faible chez les larves dont au moins un des deux géniteurs avait été préalablement exposé au nonylphenol.*





---

# Conclusion générale et perspectives

---

Les résultats des travaux présentés ici soulignent l'importance de la prise en compte de l'état physiologique des deux protagonistes du couple *C. gigas* / *A. minutum* lors de leur mise en interaction. La physiologie des huîtres, notamment le stade de maturité et la ploïdie, influence leurs réponses à la présence d'*A. minutum*. Même si cela n'a pu être réalisé dans la présente étude, il serait intéressant de mieux évaluer l'impact respectif des kystes temporaires et des cellules végétatives sur la physiologie de *C. gigas* et l'accumulation de toxines par ce bivalve.

Dans les conditions expérimentales développées dans cette étude, le dinoflagellé toxique, *A. minutum*, affecte différentes fonctions (comportement), organes (glande digestive) et tissus (hémocytes) de l'huître creuse, *C. gigas*. Certains de ces effets sont probablement dus à la production de PSTs par cette micro-algue, sans pour autant qu'il soit possible de l'affirmer. Cela pose, entre autres, la question du « témoin négatif » utilisé comme référence pour caractériser les variations observées et leurs causes. Le choix d'une micro-algue « fourrage » est évidemment discutable. Il serait intéressant d'utiliser plutôt une autre souche d'*A. minutum* non productrice de PSTs (non disponible lors de l'implémentation des expériences). Cependant, pour éviter tout artefact pouvant être lié à la présence d'une autre molécule toxique présente dans l'une ou les deux souches d'*A. minutum* (comme cela a pu être établi dans d'autres espèces d'*Alexandrium*), il apparaît important d'ajouter un second témoin négatif, « non *Alexandrium* ». Celui-ci pourrait être une autre espèce de dinoflagellé morphologiquement semblable à *A. minutum*, connue pour n'avoir aucune toxicité démontrée. *Heterocapsa triquetra* répond au moins en partie à ces critères.

Une importante variabilité interindividuelle a été observée au niveau du comportement des huîtres face à la présence d'*A. minutum*, mais aussi au niveau de l'accumulation des PSTs. Cela semble traduire une variabilité physiologique mais également des différences interindividuelles de sensibilité vis-à-vis d'*A. minutum* et/ou de ses toxines. Le choix d'utiliser des huîtres triploïdes en temps que témoin négatif d'effort de reproduction n'est pas idéal non plus : il est en effet difficile de déterminer si les différences observées sont liées au moindre effort de reproduction ou plutôt aux différences génétiques entre diploïdes et triploïdes. De même, l'utilisation de lignées de *C. gigas* ayant un historique connu pourrait permettre d'obtenir une meilleure comparaison des différentes expérimentations.

L'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* semble induire une stimulation du système immunitaire des huîtres, comme le suggère la réaction inflammatoire observée dans la glande digestive. Néanmoins, les effets sur les paramètres hématologiques sont moins nets suggérant que la mobilisation des hémocytes est très localisée.

L'exposition des huîtres à *A. minutum* perturbe également la structure et l'activité de la glande digestive, comme en témoignent les variations des contenus en lipides de réserve et structuraux observées dans cet organe. Dans le cas où ces modifications seraient confirmées,

notamment par l'utilisation d'un autre témoin négatif, il serait intéressant d'analyser la composition des lipides en acides gras et de déterminer une éventuelle peroxydation des lipides.

Une altération de la qualité des spermatozoïdes de *C. gigas* a été observée suite à l'exposition à *A. minutum*. Des observations en microscopie électronique à balayage permettraient peut-être d'observer des altérations et/ou des modifications de la structure des gamètes mâles. Il pourrait être intéressant de compléter les observations décrites dans cette étude en procédant à des tests de fécondation en utilisant des gamètes d'huîtres préalablement exposées à *A. minutum*. La recherche d'effets sur la descendance pourrait aussi être envisagée.

La variabilité interindividuelle des réponses physiologiques des huîtres exposées à *A. minutum*, mise en évidence dans la présente étude, souligne l'intérêt d'adopter une démarche probabiliste. Le principe est de considérer que tous les individus ne vont pas répondre de la même façon à une variation de leur environnement. À l'opposé, une approche déterministe considère un nombre limité de modalités de réponses possibles à une modification de l'environnement et que tous les individus appartiennent à l'une d'entre elles. Dans le cadre de la présente étude, une approche probabiliste impliquerait de mesurer tous les paramètres physiologiques retenus de façon individuelle. Une telle démarche devrait être réalisable en optimisant les quantités d'organes ou de tissus nécessaires à chaque observation ou analyse.

L'impact de *A. minutum* sur *C. gigas* observé au cours de la présente étude reste difficile à extrapoler à ce qu'il pourrait se passer dans l'environnement naturel. Il serait donc intéressant de développer la même approche lors d'une étude de terrain en choisissant un site expérimental régulièrement touché par des efflorescences de micro-algues toxiques. Il pourrait être envisagé un suivi parallèle au niveau d'un site témoin ou un suivi annuel ou pluriannuel sur un même site.

---

# Bibliographie

---

- Anderson, D.M., Wall, B., 1978. Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *Gonyaulax excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. J. Phycol. 14, 224–234.
- Anderson, R.S., Bureson, E.M., Paynter, K.T., 1995. Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. J. Invertebr. Pathol. 66, 82–89.
- Anderson, D.M., 1998. Physiology and Bloom Dynamics of Toxic *Alexandrium* Species, with Emphasis on Life Cycle Transitions. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D. and Hallegraeff, G.M. (Eds.), Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 29–47.
- Anderson, D.M., Y. Kaoru, A.W., White, 2000. Estimated annual economic impacts from harmful algal blooms in the United States. WHOI Technical Report WHOI-2000-11, Woods Hole, MA 97p.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful Algal Blooms and Eutrophication: Nutrient Sources, Composition, and Consequences. Estuaries and Coasts. 25, 704–726.
- Arzul, G., Seguel, M., Guzman, L., Erard-Le Denn, E., 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 232, 285–295.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. Paralytic shellfish poison. Biological method 959.08. In: Hellrich, K. (Ed.), Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL., Arlington, VA, pp.881-882
- Auffret, M. and Oubella, R., 1995. Cytological and cytometric analysis of bivalves molluscs hemocytes, in: (Eds: Stolen, J.S., Fletcher, C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Soderhall, K. & Weeks-Perkins, B.A.). Fair Haven: SOS Publication.
- Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. 118, 705-712.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Mar. Environ. Res. 54, 585–589.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in western Mediterranean. Ecotox. Environ. Safe. 63, 393–405.
- Backer, L., Fleming, L.E., Rowan, A., et al., 2003. Epidemiology and public health of human illnesses associated with harmful marine phytoplankton. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), Manual on Harmful Marine Algae. UNESCO/WHO, Geneva, Switzerland, pp. 725–750.
- Backer, L.C., Schurz Rogers, H., Fleming, L.E., Kirkpatrick, B., Benson, J. 2005., Phycotoxins in marine seafood. In: Dabrowski, W. (Ed.), Chemical and Functional Properties of Food Components: Toxins in Food. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 155–190.

- Bado-Nilles, A., Renault, T., Gagnaire, B., Auffret, M., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., 2007. In vitro and in vivo effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocyte parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146, S71.
- Bado-Nilles, A., Quentel, C., Auffret, M., Le Floch, S., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2009. Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1446-1454.
- Bagoien, E., Miranda, A., Reguera, B., Franco, J.M., 1996. Effects of two paralytic shellfish toxin producing dinoflagellates on the pelagic harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons*. *Mar. Biol.* 126, 361–369.
- Balech, E., 1990. Four new dinoflagellates. *Helgol Meeresunters.* 44, 387-396.
- Bardouil, M., Bohec, M., Cormerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* 12, 417–422.
- Barracco, M.A., Medeiros, I.D., Moreira, F.M., 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 387–404.
- Basti, L., Nagai, K., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., Segawa, S., 2009. Effects of the toxic dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the valve movement behaviour of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 291, 41–47.
- Belin, C., Raffin, B. 1998. Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995, résultats du REPHY (Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines). REPHY report, Ifremer, France, pp. 143.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France) *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 125, 359–369.
- Biegala, I.C., Kennaway, G., Alverca, E., Lennon, J.F., Vaulot, D., Simon, N., 2002. Identification of bacteria associated with dinoflagellates (Dinophyceae) *Alexandrium* spp. using tyramide signal amplification-fluorescent in situ hybridization and confocal microscopy. *J. Phycol.* 38, 404–411.
- Binet, M.T., Stauber, J.L., 2006. Rapid flow cytometric method for the assessment of toxic dinoflagellate cyst viability. *Mar. Environ. Res.* 62, 247–260.
- Bolli, L., Llaveria, G., Garcés, E., Guadayol, O., van Lenning, K., Peters, F., Berdalet, E., 2007. Modulation of ecdysal cyst and toxin dynamics of two *Alexandrium* (Dinophyceae) species under small-scale turbulence. *Biogeosciences* 4, 559–567.
- Borcherding, J., 2006. Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor, a biological early warning system for continuous water quality monitoring. *Hydrobiologia.* 556, 417-426.
- Bouget, J.-F., Mazurie, J., 1997. Dispositif de surveillance biologique de la qualité d'eau d'un site conchylicole estuarien utilisant un biocapteur valvaire muni d'huîtres et de moules. *Techniques Sciences Méthodes.* 11, 71-79.

- Bougrier, S., Lassus, P., Bardouil, M., Masselin, P., Truquet, P., 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding timeactivity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquat. Living Resour.* 16, 347–352.
- Bravo, I., Figueroa, R.I., Garcés, E., Massanet, S.F.A., 2009. The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: The example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep Sea Research II*, accepted MS doi:10.1016/j.dsr2.2009.09.003.
- Bricelj, V.M., Lee, J.H., Cembella, A.D., Anderson, D.M., 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63, 177–188.
- Bricelj, V.M., Lee, J.H., Cembella, A.D., 1991. Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 74, 33–46.
- Bricelj, V.M., Cembella, A.D., Laby, D., Shumway, S.E., Cucci, T.L., 1996. Comparative physiological and behavioral responses to PSP toxins in two bivalve mollusks, the softshell clam, *Mya arenaria* and surfclam, *Spisula solidissima*, in: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 405–408.
- Bricelj, V.M., Connell, L., Konoki, K., Mac-Quarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, W.A., Trainer, V.L., 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* 434, 763–767.
- Bricelj, V.M., Shumway, S.E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Res. Fish. Sci.* 6, 315–383.
- Brizard, R., Bernanrdi, M., Boudry, P., Haffray, P., Labbe, C., Maisse, G., Maurouard, E., Robert, R., Roger, J.L., 2004. Projet Cryoyster : Optimisation, standardisation et validation de la congélation de la laitance d’huître creuse *Crassostrea gigas* à des fins de conservation et de diffusion génétique. Rapport final OFIMER (03/5 210 093), 36pp.
- Brun, N.T., Ross, N.W., Boghen, A.D., 2000. Changes in electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the turbellarian *Urastoma cyprine*. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 163–170.
- Brussaard, C.P.D., Marie, D., Thyraug, R., Bratbak, G., 2001. Flow cytometric analysis of phytoplankton viability following viral infection. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 157–166.
- Burkholder, J.M., 1998. Implications of harmful marine microalgae and heterotrophic dinoflagellates in management of sustainable marine fisheries. *Ecological Applications* 8 (Suppl.): S37–62.
- Carroll, M.A., Catapane, E.J., 2007. The nervous system control of lateral ciliary activity of the gill of the bivalve mollusc *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 148, 445–450.
- Cembella, A.D., Todd, E., 1993. Seafood toxins of algal origin and their control in Canada, in: Falconer, E.R. (Ed), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 129–144.

- Chambon, C., Legeay, A., Durrieu, G., Gonzalez, P., Ciret, P., Massabuau, J.-C., 2007. Influence of the parasite worm *Polydora* sp. on the behavior of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Mar. Biol.* 152, 329–338.
- Chang, F.H., Mackenzie, L., Till D., Hannah, D., Rhodes, L., 1995. The first toxic shellfish outbreaks and the associated phytoplankton blooms in early 1993 in New Zealand, in: Lassus, P., Arzul, G., Gentien, P. Marcaillou, C. (Eds), *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier Publisher, Paris, pp.145-150.
- Chang, F.H., Anderson, D.M., Kulis, D.M., Till, D.G., 1997. Toxin production of *Alexandrium minutum* (dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand. *Toxicon* 35, 393–409.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: Forms and functions. In: *The Eastern Oyster Crassostrea virginica* (V.S. Kennedy, R.I.E. Newell, & A.F. Eble, eds.), pp. 299- 333. Maryland Sea Grant, College Park, MD, USA.
- Cheng, T.C., 2000. Cellular defense mechanisms in oysters. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (eds) *Recent Advances in Marine Biotechnology*. Enfield: Science Publishers Inc. Vol. 5, 43–83.
- Chou, H.N., Chen, Y.M., Chen, C.Y., 2004. Variety of PSP toxins in four culture strains of *Alexandrium minutum* collected from southern Taiwan. *Toxicon* 43, 337–340.
- Chu, F.-L.E. (1988). Humoral defense factors in marine bivalves. *American Fisheries Society Special Publication* 18, 178–188.
- Chu, F.L.E., La Peyre, J.F., 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. *Dis. Aquat. Org.* 16, 223–234.
- Chu, F.L.E., La Peyre, J.F., Bureson, C.S., 1993. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: salinity effects. *J. Invertebr. Pathol.* 3, 226–232.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (eds) *Recent Advances in Marine Biotechnology*. Enfield: Science Publishers Inc. Vol. 5, pp. 1-42.
- Chu, F.L.E., Soudant, P., Hale, R.C., 2003. Relationship between PCB accumulation and reproductive output in conditioned oysters *Crassostrea virginica* fed a contaminated algal diet. *Aquat. Toxicol.* 65, 293–307.
- Collodel, G., Moretti, E., 2008. Morphology and Meiotic Segregation in Spermatozoa From Men of Proven Fertility. *J. Androl.* 29, 106–114.
- Cossarizza, A., Ceccarelli, D., Masini, A., 1996. Functional Heterogeneity of an Isolated Mitochondrial Population Revealed by Cytofluorometric Analysis at the Single Organelle Level. *Exp. Cell Res.* 222, 84–94.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain, J.F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053–3064.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.F., 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254, 571–582.



- Delaporte, M., Chu, F.E., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J.F., Soudant, P., 2007a. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *J Exp Mar Biol Ecol* 342, 261-275.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Dégremont, L., Boudry, P., Samain, J.F., 2007b. Characterization of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 353, 45-57.
- Delwiche, C.F., 1999. Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *The American Naturalist*. 154, 164–177.
- Doherty, F.G., Cherry, D.S., Cairns, J. Jr., 1987. Valve closure response of the Asiatic clam *Corbicula fluminea* exposed to cadmium and zinc. *Hydrobiologia*. 153, 159-167.
- Dolmer, P., 2000. Feeding activity of mussels *Mytilus edulis* related to near-bed currents and phytoplankton biomass. *J. Sea Res.* 44, 221–231.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.-S., Soudant, P., 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture*. 297, 10-24.
- Dong, Q., Huang, C., Tierscha, T.R., 2005. Spermatozoal ultrastructure of diploid and tetraploid Pacific oysters. *Aquaculture* 249, 487– 496.
- Doucette, G.J., Cembella, A.D., Boyer, G.L., 1989. Cyst formation in the red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarens* (Dinophyceae): Effects of iron stress. *J. Phycol.* 25, 721–731.
- Dubelaar, G.B.J., Jonker, R.R., 2000. Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Sci. Mar.* 64, 135–156.
- Dupuy, J.L., Sparks, A.K., 1967. *Gonyaulax washingtonensis*, its relationship to *Mytilus californianus* and *Crassostrea gigas* as a source of PSP toxin in Sequim bay, Washington. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.* 58, 2-12.
- EFSA Journal, 2009. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. 1306, 1–23.
- Emura, A., Matsuyama, Y., Oda, T., 2004. Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori*. *Harmful Algae* 3, 29–37.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacult. Int.* 17, 491-506.
- Erard-Le Denn, E., 1997. *Alexandrium minutum*. In: Berland, B., Lassus, P. (Eds.), Efflorescences toxiques dans les eaux côtières françaises. Repère Océan, IFREMER, pp. 52–56.
- Erkkila, K., Kytanen, S., Wikstrom, M., Taari, K., Sinha Hikim, A.P., Swerdloff, R.S., Dunkell, L., 2006. Regulation of human male germ cell death by modulators of ATP production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E1145–E1154.

- Estrada, N., de Jesus Romero, M., Campa-Cordova, A., Luna, A., Ascencio, F., 2007. Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 146, 502–510.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. Aquaculture. 250, 458–470.
- Fantone, J.C., Ward, P.A., 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am. J Pathol. 107, 395–418.
- FAO, 2000. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 142pp.
- FAO, 2006. FAO Statistics database. <http://faostat.fao.org/>.
- Farias, A., Bell, J.G., Uriarte, I., Sargent, J.R., 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. Aquaculture 228, 289–305.
- Fernández, M.L., Shumway, S., Blanco, J., 2003. Management of shellfish resources. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. G.M. Hallegraeff, M. Anderson, A.D Cembella (eds.). IOC Manuals and Guides, UNESCO, pp 657–692.
- Fernández-Reiriz, M.J., Navarro, J.M., Contreras, A.M., Labarta, U., 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: Feeding and digestive behaviour to long-term exposure. Aquat. Toxicol. 87, 245–251.
- Figuerola, R.I., Bravo, I., 2005. Sexual reproduction and two different encystment strategies of *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) in culture. J. Phycol. 41, 370–379.
- Figuerola, R.I., Bravo, I., Garcés, E., 2005. Effects of nutritional factors and different parental crosses on the encystment and excystment of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture. Phycologia 44, 658–670.
- Figuerola, R.I., Garcés, E., Bravo, I., 2007. Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (Gonyaulacales, dinophyceae) in culture. J. Phycol. 43, 1039–1053.
- Figuerola, R.I., Bravo, I., Garcés, E., 2008. The significance of sexual versus asexual cyst formation in the life cycle of the noxious dinoflagellate *Alexandrium peruvianum*. Harmful Algae 7, 653–663.
- Fisher, W.S., 1992. Occurrence of agglutinins in the pallial cavity mucus of oysters. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 162, 1–13.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. Aquat. Toxicol. 51, 115–138.
- Fistarol, G.O., Legrand, C., Rengefors, K., Granéli, E., 2004. Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? Environ. Microbiol. 6, 791–798.
- Fong, P.P., Deguchi, R., Kyozuka, K., 1996. Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from central Japan. Biol. Bull. 191, 27–32.

- Ford, S.E., Kanaley, S.A., Littlewood, D.T.J., 1993. Cellular Responses of Oysters Infected with *Haplosporidium nelsoni*: Changes in Circulating and Tissue-Infiltrating Hemocytes. J. Invertebr. Pathol. 61, 49–57.
- Ford, S.E., Bricelj, V.M., Lambert, C., Paillard, C., 2008. Deleterious effects of a nonPST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarense* on bivalve hemocytes. Mar. Biol. 154, 241–253.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P., 2001. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. Toxicology 161, 201–211.
- Frangópulos, M., Guisande, C., Maneiro, I., Riveiro, I., Franco, J., 2000. Short-term and long-term effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* on the copepod *Acartia clausi*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 203, 161–169.
- Frank, D.M., Hamilton, J.F., Ward, J.E., Shumway, S.E., 2007. A fiber optic sensor for high resolution measurement and continuous monitoring of valve gape in bivalve molluscs. J. Shellfish Res. 26, 575–580.
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A., 2000. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. Sci. Total Environ. 247, 119–126.
- Gagnaire, B., 2005. Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huitre creuse, *Crassostrea gigas*. Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses, Ph.D. thesis, La Rochelle.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Faury, N., Kerdudou, N., Le Moine, O., Renault, T., 2007. Analysis of hemocyte parameters in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field. Comparison of hatchery diploids and diploids from natural beds. Aquaculture 264, 449–456.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T., Renault, T., 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. Cell Biol. Toxicol. 22, 1–14.
- Gainey, L.F., Shumway, S.E., 1988. A compendium of the response of bivalve mollusks to toxic dinoflagellates. J. Shellfish Res. 7, 623–628.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008a. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. Harmful Algae 7, 702–711.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008b. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. Harmful Algae 7, 630–638.
- Galimany, E., Place, A.R., Ramon, M., Jutson, M., Pipe, R.K., 2008c. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis*. Harmful Algae 7, 91–98.
- Garcés, E., Delgado, M., Masó, M., Camp, J., 1998. Life history and in situ growth rates of *Alexandrium taylori* (Dinophyceae, Pyrrophyta). J. Phycol. 34, 880–887.
- Garcés, E., Masó, M., Camp, J., 1999. A recurrent and localized dinoflagellate bloom in a Mediterranean beach. J. Plankton Res. 21, 2373–2391.

- Garcia-March, J.R., Sanchis Solsona, M.A., Garcia-Carrascosa, A.M., 2008. Shell gaping behavior of *Pinna nobilis* L., 1758: circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Mar. Biol.* 153, 689–698.
- Gatsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica*. in: Fisheries bulletin. p. 480.
- Glibert, P.M., Conley, D.J., Fisher, T.R., Harding, L.W., Malone, T.C., 1995. Dynamics of the 1990 winter/spring bloom in Chesapeake Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122, 27–43.
- Goedken, M., De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* 16 (4): 539–552
- Grizel, H., Auffret, M. 2003. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Editions Quae. 201 p.
- Grzebyk, D., Berland, B., 1996. Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *J. Plankton Res.* 18, 1837–1849.
- Guéguen, M., Bardouil, M., Baron, R., Lassus, P., Truquet, P., Massardier, J., Amzil, Z., 2008. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat. Living Resour.* 21, 13–20.
- Guerrier, P., Leclerc-David, C., Moreau, M., 1993. Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*. *Dev. Biol.* 159, 474–484.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234–236.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E., Lassus, P., Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 97, 96–108.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Moal, J., Suquet, M., Gueguen, M., Sunila, I., Soudant, P., in press. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*.
- Halim, Y., 1960. *Alexandrium minutum*, nov. gen. nov. sp. Dinoflagellé provocant des «eaux rouges». *Vie et Milieu.* 11, 102–105.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia.* 32, 79–99.
- Hégaret, H., 2007. Impacts of Harmful Algal Blooms on Physiological and Cellular Processes of Bivalve Molluscs. Thesis. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., 2005. Effects of natural and field-simulated blooms of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* upon hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, from two different populations. *Harmful Algae* 4, 201–209.
- Hégaret, H., Wikfors, G., Soudant, P., Lambert, C., Shumway, S., Bérard, J., Lassus, P., 2007a. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* 152, 441–447.

- Hégaret, H., da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S.E., Soudant, P., 2007b. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquat. Toxicol.* 84, 469–479.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Shumway, S.E., 2007c. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. *J. Shellfish Res.* 26, 549–559.
- Hégaret, H., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Pate, S., Burkholder, J.M., 2008a. Potential transport of harmful algae via relocation of bivalve mollusks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 361, 169–179.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Shumway, S.E., 2008b. In vitro interactions between several species of harmful algae and hemocytes of bivalve molluscs. *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae*, Copenhagen, Denmark.
- Hégaret, H., da Silva, P., Sunila, I., Dixon, M.S., Alix, J., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2009a. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 371, 112–120.
- Hégaret, H., Shumway, S. E., Wikfors, G.H., 2009b. Biotoxin contamination and shellfish safety. In Shumway, S.E. and G.E. Rodrick (eds). *Shellfish Safety and Quality*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK p43-80.
- Hégaret, H., da Silva, P., submitted. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.*
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 433–440.
- His, E., 1970. L'émission des gamètes chez l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* LMK). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 34, 17-22.
- Hoagland, P., Anderson, D.M., Kaoru, Y., White, A.W., 2002. The Economic Effects of Harmful Algal Blooms in the United States: Estimates, Assessment Issues, and Information Needs. *Estuaries* 25, 819–837.
- Hoagland, P., Scatasta, S., 2006. The economic effects of harmful algal blooms. In: Graneli, E., Turner, J., (Eds.) *Ecology of Harmful Algae*. Ecology Studies Series. Springer-Verlag, Dordrecht, The Netherlands, pp. 391–402.
- Hopkins, A.E., 1931. Temperature and shell movements of the oyster (*Ostrea gigas*). *Bull. U.S. Bur. Fish.*, 47, 1-14.
- Howlett, N.G., Avery, S.V., 1999. Flow cytometric investigation of heterogeneous copper-sensitivity in asynchronously grown *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 379–386.
- Hu, T., Curtis, J.M., Oshima, Y., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Watson-Wright, W., Wright, J.L.C., 1995. Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 2159–2161.
- Huss, H.H., 2003. Aquatic biotoxins. Chapter 5.1.5. in Huss, H.H.; Ababouch, L.; Gram, L., *Assessment and Management of Seafood Safety and Quality*. FAO Fisheries Technical Paper. 239 p.

- Huvet, A., Daniel, J.Y., Quéré, C., Dubois, S., Prudence, M., Van Wormhoudt, A. Sellos, D., Samain, J.F., Moal, J., 2003. Tissue expression of two  $\alpha$ -amylase genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture* 228, 321–333.
- Hwang, D.F., Lu, Y.H., 2000. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon*. 38, 1491–1503.
- Ignatiades, L., Gotsis-Skretas, O., Metaxatos, A., 2007. Field and culture studies on the ecophysiology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Halim) present in Greek coastal waters. *Harmful Algae* 6, 153–165.
- Jacobson, D.M., Anderson, D.M., 1996. Widespread phagocytosis of ciliates and other protists by marine mixotrophic and heterotrophic thecate dinoflagellates. *Journal of Phycology*. 32, 279–285.
- Janeway, C.A. 1994. The role of microbial pattern recognition in self:nonsself discrimination in innate and adaptive immunity. In Hoffmann, J.A., Janeway, C.A., Natori, S. (eds): *Phylogenetic perspectives in immunity, the insect host defence*; RG Landes Company, Austin, TX, pp 115-122.
- Jensen, M.O., Moestrup, Ø., 1997. Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: Life history and growth at different temperatures and salinities. *Eur. J. Phycol.* 32, 9–18.
- Johnson, R.M., Shrimpton, J.M., Cho, G.K., Heath, D.D., 2007. Dosage effects on heritability and maternal effects in diploid and triploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Heredity* 98, 303–310.
- Kádár, E., Salánki, J., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., McCrohan, C.R., White, K.N., 2001. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquat. Toxicol.* 55, 137–148.
- Kermarec, F., Dor, F., Armengaud, A., Charlet, F., Kantin, R., Sauzade, D., de Haro, L., 2008. Les risques sanitaires liés à la présence d'*Ostreopsis ovata* dans les eaux de baignade ou d'activités nautiques. *Environnement, Risques & Santé. Volume 7 : Pages 357-363.* Archimer.
- Kim, C.S., Lee, S.G., Kim, H.G., 2000. Biochemical responses of fish exposed to a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254, 131–141.
- Kim, C.-J., Kim, C.-H., Sako, Y., 2005. Development of Molecular Identification Method for Genus *Alexandrium* (Dinophyceae) Using Whole-Cell FISH. *Mar. Biotechnol.* 7, 215–222.
- Kittner, C., Riisgard, H. U., 2005. Effect of temperature on filtration rate in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for temperature compensation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 305, 147-152.
- Kramer, K.J.M., Jenner, H.A., De Zwart, D., 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*. 188/189, 433-443.
- Kramer, K.J.M., Foekema, E.M., 2001. The “Musselmonitor” as biological early warning system: The first decade, in: Butterworth, F.M., Gensebatt-Bonaparte, M.E., Gunatilaka, A. (Eds), *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: A handbook*; Vol. II. Plenum, New York, pp. 59-87.
- Kremp, A., Parrow, M.W., 2006. Evidence for asexual resting cysts in the life cycle of the marine peridinioid dinoflagellate, *Scrippsiella hangoei*. *J. Phycol.* 42, 400–409.



- Laabir, M., Gentien, P., 1999. Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. J. Shellfish Res. 18, 217–222.
- Laabir, M., Amzil, Z., Lassus, P., Masseret, E., Tapilatu, Y., De Vargas, R., Grzebyk, D., 2007. Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. Aquat. Living Resour. 20, 51–57.
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M., Navarro, J., Velasco, A., 2002. Enzymatic digestive activity in epifaunal (*Mytilus chilensis*) and infaunal (*Mulinia edulis*) bivalves in response to changes in food regimes in a natural environment. Mar. Biol. 140, 669–676.
- LaFont, R., 2000. The Endocrinology of Invertebrates. Ecotoxicology 9, 41–57.
- Lage, O.M., Sansonetty, F., O'Connor, J.E., Parente, A.M., 2001. Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Cytometry 44, 226–235.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. Fish Shellfish Immunol. 15, 225–240.
- Lambert, C., Soudant, P., Dégremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Jean, F., Huvet, A., Samain, J.-F., 2007a. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. Aquaculture 270, 276–288.
- Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J., Samain, J.-F., 2007b. *In vitro* modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. Aquaculture 270, 413–421.
- Lambert, C., Moal, J., Le Moullac, G., Pouvreau, S., 2008. Mortality risks associated with physiological traits of oysters during reproduction. In: Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project. Samain J.F. and McCombie H. (eds). Ed. Ifremer/Quæ, Versailles, France, pp. 63–106.
- Landsberg, J.H., 1996. Neoplasia and biotoxins in bivalves: Is there a connection? Journal of Shellfish Research Res. 15, 203–230.
- Landsberg, J.H., 2002. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. Fish. Sci. 10, 113–390.
- Larsson, K., Quinn, P., Sato, K., Tiberg, F., 2006. Lipids: structure, physical properties and functionality. The Oily Press. 19, pp280.
- Lassus, P., Bardouil, M., Ledoux M., Murail, I., Bohec, M., Truquet, P., Frémy, J.-M., Rohmer, V., 1992. Paralytic phycotoxin uptake by scallops (*Pecten maximus*). Aquat. Living Resour. 5, 319–324.
- Lassus, P., Wildish, J., Bardouil, M., Martin, J.L., Bohec, M., Bougrier, S., 1996. Ecophysiological study of toxic *Alexandrium* spp. Effects on the oyster *Crassostrea gigas*, in: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 409–412.

- Lassus, P., Bardouil, M., Beliaeff, B., Masselin, P., Naviner, M., Truquet, P., 1999. Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim on the feeding behavior of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.* 18, 211–216.
- Lassus, P., Bardouil, M., Masselin, P., Naviner, M., Truquet, P., 2000. Comparative efficiencies of different non-toxic microalgal diets in detoxification of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Nat. Toxins* 9, 1–12.
- Lassus, P., Baron, R., Garen, P., Truquet, P., Masselin, P., Bardouil, M., Leguay, D., Amzil, Z., 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 17, 207–214.
- Lassus, P., Bardouil, M., Baron, R., Bérard, J.B., Masselin, P., Truquet, P., Pitrat, J.P., 2005. Improving detoxification efficiency of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture Europe*, 3–6.
- Lassus, P., Amzil, Z., Baron, R., Séchet, V., Barillé, L., Abadie, E., Bardouil, M., Sibat, M., Truquet, P., Bérard, J.B., Gueguen, M., 2007. Modelling the accumulation of PSP toxins in Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii*. *Aquat. Living Resour.* 20, 59–67.
- Le Moine, S., Sellos, D., Moal, J., Daniel, J.Y., San Juan, S.F., Samain, J.F., Van Wormhoudt, A., 1997. Amylase on *Pecten maximus* (mollusca, bivalves): protein and cDNA characterization; quantification of the expression in the digestive gland. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 6, 228–237.
- Leverone, J.R., Blake, N.J., Pierce, R.H., Shumway, S.E., 2006. Effects of the dinoflagellate *Karenia brevis* on larval development in three species of bivalve mollusc from Florida. *Toxincon* 48, 75–84.
- Li, S.C., Wang, W.X., 2001. Radiotracer studies on the feeding of two marine bivalves on the toxic and nontoxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 263, 65–75.
- Li, S.C., Wang, W.X., Hsieh, D., 2001. Feeding and absorption of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by two marine bivalves from the South China Sea. *Mar. Biol.* 139, 617–624.
- Li, S.C., Wang, W.X., Hsieh, D.P.H., 2002. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Mar. Environ. Res.* 53, 145–160.
- Lilly, E.L., Halanych, K.M., Anderson, D.M., 2005. Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the *Alexandrium minutum* group. *Harmful Algae* 4, 1004–1020.
- López-Sánchez, J.A., Maeda-Martínez, A.N., Croll, R.P., Acosta-Salmón, H., 2009. Monoamine fluctuations during the reproductive cycle of the Pacific lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 154, 425–428.
- Lucas, A., Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*. 44, 187–200.
- Lucas, A., Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44, 187–200.

- Luckenbach, M. W., Sellner, K. G., Shumway, S. E., and Greene, K., 1993. Effects of two bloom-forming dinoflagellates, *Prorocentrum minimum* and *Gyrodinium uncatenum*, on the growth and survival of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791). *Journal of Shellfish Research* 12(2), 411-415.
- Lush, G.J., Hallegraeff, G.M., Munday, B.L., 1996. High toxicity of the red tide dinoflagellate *Alexandrium minutum* to the brine shrimp *Artemia salina*, in: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds), Harmful and toxic algal blooms. UNESCO, Paris, pp 389-392.
- Lush, G.J., Hallegraeff, G.M., Munday, B.L., 1997. Harmful Algae, chap. Histopathological effects in juvenile green black flounder *Rhombosolea taparina* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. pp. 609-610.
- MacKinnon, S.L., Walter, J.A., Quilliam, M.A., Cembella, A.D., LeBlanc, P., Burton, I.W., Hardstaff, W.R., Lewis, N.I., 2006. Spirolides Isolated from Danish Strains of the Toxigenic Dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *J. Nat. Prod.* 69, 983-987.
- Magoulas, A., Kotoulas, G., Gerard, A., Naciri-Graven, Y., Dermitzakis, E., Hawkins, A.J.S., 2000. Comparison of genetic variability and parentage in different ploidy classes of the japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Genet. Res.* 76, 261-272.
- Mancini, M., Anderson, B.O., Caldwell, E., Sedghinasab, M., Paty, P.B., Hockenbery, D.M., 1997. Mitochondrial Proliferation and Paradoxical Membrane Depolarization during Terminal Differentiation and Apoptosis in a Human Colon Carcinoma Cell Line. *J. Cell Biol.* 138, 449-469.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.* 59, 95-110.
- Marceau, F., 1909. Recherche sur la morphologie, l'histologie et la physiologie comparée des muscles adducteurs des mollusques acéphales. *Arch. Zool. Exp. Gén. (ser 5)*, 2, 295 - 469.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaultot, D., 1997. Enumeration and Cell Cycle Analysis of Natural Populations of Marine Picoplankton by Flow Cytometry Using the Nucleic Acid Stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 186-193.
- Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D., Brussaard, C., 1999. Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples, in: Robinson, J.P. (Ed.), *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 11.11.11-11.11.15.
- Marie, D., Simon, N., Vaultot, D., 2005. Phytoplankton cell counting by flow cytometry. In R. A. Andersen. (eds), *Algal Culturing Techniques*. Academic Press, Elsevier, San Diego, California, pp. 253-267.
- Markich, S.J., Brown, P.L., Jeffree, R.A., Lim, R.P., 2000. Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquat. Toxicol.* 51, 155-175.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., Grassé, P.P., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Paris, Masson. pp. 345.
- Masó, M., Garcés, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine pollution bulletin.* 53, 620-630.

- Medler, S., Silverman, H., 2001. Muscular alteration of gill geometry in vitro: implications for bivalve pumping processes. *Biol. Bull.* 200, 77-86.
- Moeller, P.D.R., Morton, S.L., Mitchell, B.A., Sivertsen, S.K., Fairey, E.R., Mikulski, T.M., Glasgow, H., Deamer-Melia, N.J., Burkholder, J.M., Ramsdell, J.S., 2001. Current progress in isolation and characterization of toxins isolated from *Pfiesteria piscicida*. *Environmental Health Perspectives* 109:739-743.
- Moestrup, Ø., Codd, G.A., Elbrächter, M., Faust, M.A., Fraga, S., Fukuyo, Y., Cronberg, G., Halim, Y., Taylor, F.J.R., Zingone, A., 2002. IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, <http://ioc.unesco.org/hab/data4taxlist.htm>.
- Møller, L.F., Riisgård, H.U., 2007. Impact of jellyfish and mussels on algal blooms caused by seasonal oxygen depletion and nutrient release from the sediment in a Danish fjord. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 351, 92–105.
- Montresor, M., 1995. The life history of *Alexandrium pseudogonyaulax* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia* 34, 444–448.
- Moreno Diaz de la Espina, S., Alverca, E., Cuadrado, A., Franca, S., 2005. Organization of the genome and gene expression in a nuclear environment lacking histones and nucleosomes: The amazing dinoflagellates. *Eur. J. Cell Biol.* 84, 137–149.
- Morin, P., Erard-Le Denn, E., Maguer, J.F., Madec, C., Videau, C., Legrand, J., Macé, E., 2000. Étude des causes de prolifération de microalgues toxiques en mer : cas d'*Alexandrium*. Final AELB report, Convention 7.98.9476, 135 p.
- Moronõ, A., Franco, J., Miranda, M., Reyero, M.I., Blanco, J., 2001. The effect of mussel size, temperature, seston volume, food quality and volume-specific toxin concentration on the uptake rate of PSP toxins by mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). *Journal of experimental marine biology and ecology*. 257, 117–132.
- Morrill, L.C., Loeblich, A.R., 1981. The dinoflagellate pellicular wall layer and its occurrence in the division Pyrrhophyta. *Phycol.* 17, 315–323.
- Nagai, K., Honjo, T., Go, J., Yamashita, H., Oh, S.J., 2006. Detecting the shellfish killer *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) by measuring bivalve valve activity with a Hall element sensor. *Aquaculture* 255, 395–401.
- Nagasaki, K., Yamaguchi, M., Imai, I., 2000. Algicidal activity of a killer bacterium against the harmful red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* isolated from Ago Bay, Japan. *Nippon-Suisan-Gakkaish* 66, 666–673.
- Narahashi, T., Moore, J.W., 1968. Neuroactive agents and nerve membrane conductances. *J. Gen. Physiol.* 51, 93–101.
- Narahashi, T., 1988. Mechanism of tetrodotoxin and saxitoxin action. In: *Handbook of Natural Toxins. Marine Toxins and Venoms*, (Tiu, A.T., Ed.) New York: Marcel Dekker Inc. 3, 185–210.
- Navarro, J.M., Contreras, A.M., Chaparro, O.R., 2008. Short-term feeding response of the mussel *Mytilus chilensis* exposed to diets containing the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 81, 41–49.
- Nell, J.A., 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture*. 210, 69–88.

- Nelson, T.C., 1921. Report of the department of Biology of the New Jersey Agricultural College Experiment Station, New Brunswick, N.J. for the year ending June 30<sup>th</sup> 1920. Publ. by the State, Trenton N.J., 317-349.
- Nice, H.E., 2005. Sperm motility in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is affected by nonylphenol. Mar. Pollut. Bull. 50, 1668–1674.
- Normand, J., Le Pennec, M., Boudry, P., 2008. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in france during the 2003 heatwave. Aquaculture 282, 124–129.
- Olive, P.J.W., 1995. Annual breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony. J. therm. Biol. 20, 79–90.
- Olli, K., 2004. Temporary cyst formation of *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae) in natural populations. Mar. Biol. 145, 1–8.
- Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M., Yasumoto, T., 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Toxic Marine Phytoplankton, (Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M., Eds.) New York: Elsevier Science Publishers, pp. 391–396.
- Oshima, Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J AOAC Int. 78, 528–532.
- Østergaard, M., Moestrup, O., 1997. Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: life history and growth at different temperatures and salinities. European Journal of Phycology 32, 9-18.
- Padilla, D.K., Doall, M.H., Gobler, C.J., Hartson, A., O’Boyle, K., 2006. Brown tide alga, *Aureococcus anophagefferens*, can affect growth but not survivorship of *Mercenaria mercenaria* larvae. Harmful Algae 5, 736–748.
- Page, F.H., Martin, J.L., Hanke, A., 2001. Annual timing of phytoplankton blooms in the western Bay of Fundy. In: Environmental studies for Sustainable Aquaculture (ESSA). 2001 workshop report. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 2352, pp. 16-18.
- Pazos, A.J., Ruiz, C., Garcia-Martin, O., Abad, M., Sanchez, J.L., 1996. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, N.W. Spain. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 114, 171–179.
- Pazos, A.J., Sánchez, J.L., Román, G., Pérez-Parallé, M.L., Abad, M., 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 134, 367–380.
- Pearce, I., Handler, J.H., Hallegraeff, G.M., 2005 Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum*. Harmful Algae. 4:61-74
- Persson, A., Smith, B.C., Wikfors, G.H., Quilliam, M. 2006. Grazing on toxic *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Harmful Algae 5, 678–684.
- Pfiester, L.A., Anderson, D.M., 1987. Dinoflagellate reproduction. In: Taylor, F.J.R. (Ed.), The Biology of Dinoflagellates. Blackwell Science, Oxford, pp. 611–648.

- Pierce, R.H., Henry, M.S., Blum, P.C., Hamel, S.L., Kirkpatrick, B., Cheng, Y.S., Zhou, Y., Irvin, C.M., Naar, J., Weidner, A., Fleming, L.E., Backer, L.C., Baden, D.G., 2005. Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins. *Harmful Algae* 4, 965–972.
- Prudence, M., Moal, J., Boudry, P., Daniel, J.Y., Quere, C., Jeffroy, F., Mingant, C., Ropert, M., Bedier, E., Van Wormhoudt, A., Samain, J.F., Huvet, A., 2006. An amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*. *Anim. Genet.* 37, 348–351.
- Ranston, E.R., Webber, D.F., Larsen, J., 2007. The first description of the potentially toxic dinoflagellate, *Alexandrium minutum* in Hunts Bay, Kingston Harbour, Jamaica. *Harmful Algae* 6, 29–47.
- Reers, M., Smith, T.W., Chen, L.B., 1991. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 30, 4480–4486.
- Reid, H.I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., Birkbeck, T.H., 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 56, 249–258.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., Robert, R., 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287, 395–401.
- Riddle, N.C., Kato, A., Birchler, J.A., 2006. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.* 114, 101–111.
- Ringwood, A.H., Hoguet, J., Keppler, C., Gielazyn, M., 2004. Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters--*Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 58, 151–155.
- Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125–145.
- Rodger, H.D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated with pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. *J. Fish Dis.* 17, 177–181.
- Rowley, A. F. and Powell, A., 2007. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? *Journal of Immunology*. 179, 7209–7214.
- Royer, J., Segueineau, C., Park, K.-I., Pouvreau, S., Choi, K.-S., Costil, K., 2008. Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture* 277, 313–320.
- Rurangwa, E., Biegniowska, A., Slominska, E., Skorkowski, E.F., Ollevier, F., 2002. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 131, 335–344.
- Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: A successful approach? *Cytom. Part A* 64A, 16–26.
- Samain, J.F., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R., 1977. Trypsine, amylase et protéines du zooplancton: dosage automatique et manuel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 29, 279–289.



- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*. 268, 227–243.
- Samain, J.F., McCombie, H., 2008 (Eds). Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, The Morest Project, Quae editions, Versailles, 379 pp.
- Saout, C., Quéré, C., Donval, A., Paulet, Y.-M., Samain, J.-F., 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). *Aquaculture* 172, 301–314.
- Sekida, S., Horiguchi, T., Okuda, K., 2001. Development of the cell covering in the dinoflagellate *Scrippsiella hexapraeicingula* (Peridiniales, Dinophyceae). *Phycol. Res.* 49, 163–176.
- Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35, 325–347.
- Shumway, S. E., Cucci, T. L., Gainey, L., Yentsch, C. M., 1985. A preliminary study of the behavioral and physiological effects of *Gonyaulax tamarensis* on bivalve molluscs. in Anderson, D. M., White, A. W., Baden, D., (Eds.) *Toxic dinoflagellates*. New York: Elsevier Science publishing. pp. 389–394.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 10, 9–27.
- Shumway, S.E., Sherman-Caswell, S., Hurst, J.W., 1988. Paralytic shellfish poisoning in Maine: monitoring a monster. *J. Shellfish Res.* 7, 643–652.
- Shumway, S. E., 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal of World Aquaculture Society*. 21, 65–104.
- Shumway, S.E., Burkholder, J.A.M., Springer, J., 2006. Effects of the estuarine dinoflagellate *Pfiesteria shumwayae* (Dinophyceae) on survival and grazing activity of several shellfish species. *Harmful Algae* 5, 442–458.
- Singh, N.P., Muller, C.H., Berger, R.E., 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil. Steril.* 80, 1420–1430.
- Smayda, T. J., 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic. In: *Toxic Marine Phytoplankton* (Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D. M., (Eds.). New York: Academic Press. pp. 29–40.
- Smolowitz, R., Shumway, S.E., 1997. Possible cytotoxic effects of the dinoflagellate, *Gyrodinium aureolum*, on juvenile bivalve molluscs. *Aquacult. Int.* 5, 291–300.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Masski, H., Samain, J.F., 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 121, 279–288.
- Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 123, 209–222.

- Sournia, A., 1995. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity. In: Harmful Marine Algal Blooms, (Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le-Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le-Baut, C., (Eds.). Paris: Lavoisier. pp. 103–112.
- Speare, D. J., Brackett, J., Ferguson, H. W., 1989. Sequential pathology of gills of coho salmon with a combined diatom and microsporidian gill infection. *Can. Vet. J.* 30, 571–575.
- Springer, J.J., Shumway, S.E., Burkholder, J.A.M., Glasgow, H.B., 2002. Interactions between the toxic estuarine dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* and two species of bivalve mollusks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 245, 1–10.
- Stachowski-Haberkorn, S., Beker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., de la Broise, D., 2008. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ experiment. *Aquat. Toxicol.* 89, 232–241.
- Stachowski-Haberkorn, S., Beker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Quiniou, L., de la Broise, D., 2009. Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities. *Ecotoxicology*, 18, 364–376.
- Stauber, J., Franklin, N.M., Adams, M., 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends Biotechnol.* 20, 141–143.
- Summerson, H.C., Peterson, C.H., 1990. Recruitment failure of the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus*, during the first red tide, *Ptychodiscus brevis*, outbreak recorded in North Carolina. *Estuaries and Coasts*. 13, 322–331.
- Tang, Y.Z., Kong, L., Holmes, M.J., 2007. Dinoflagellate *Alexandrium leei* (Dinophyceae) from Singapore coastal waters produces a water-soluble ichthyotoxin. *Mar. Biol.* 150, 541–549.
- Taylor, F.J.R., 1987. The Biology of Dinoflagellates. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 785 pp.
- Tester, P. A., Mahoney, B., 1995. Implication of the diatom *Chaetoceros convolutus*, in the death of Red King Crabs, *Paralithoides camtschatica*. In : Harmful Marine Algal Blooms. (Eds.), P. Lassus, Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. Lavoisier, Paris, France. pp.95-100.
- Tillmann, U., John, U., 2002. Toxic effects of *Alexandrium spp.* on heterotrophic dinoflagellates: an allelochemical defence mechanism independent of PSP-toxin content. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 230, 47–58.
- Tillmann, U., Alpermann, T., John, U., Cembella, A., 2008. Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists. *Harmful Algae* 7, 52–64.
- Toyofuku, H., 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Poll. Bull.* 52, 1735–1745.
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.-C., 2000. Mechanism of oxygen consumption maintenance under varying levels of oxygenation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can. J. Zool.*, 78, 2027–2036.
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.C., 2003a. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Envir. Tox. Chem.* 22, 914–920.

- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., Massabuau, J.C., 2003b. Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquat. Toxicol.* 65, 317–327.
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., 2003c. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 116–122.
- Tran, D., Bourdineaud, J.-P., Massabuau, J.-C., Garnier-Laplace, J., 2005. Modulation of uranium bioaccumulation by hypoxia in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: induction of multixenobiotic resistance protein and heat shock protein 60 in gill tissues. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2278–2284.
- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., Massabuau, J.C., 2007. Inorganic mercury detection by valve closure response in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: integration of time and water metal concentration changes. *Envir. Tox. Chem.* 26, 1545–1551.
- Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P., Massabuau, J.C., 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*. 298, 338–335.
- UNESCO, 2004. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert. Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, 26–30
- Van Dolah, 2000. Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects, and Their Increased Occurrence. *Environmental Health Perspectives*. 108, 133pp
- Velasco, L.A., Barrosa, J., Acosta, E., 2007. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Aquaculture* 266, 153–165.
- Veldhuis, M.J.W., Cucci, T.L., Sieracki, M.E., 1997. Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: taxonomic and ecological implications. *J. Phycol.* 33, 527–41.
- Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., 2000. Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Sci. Mar.* 64, 121–134.
- Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., Timmermans, K.R., 2001. Cell death in phytoplankton: correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth. *Eur. J. Phycol.* 36, 167–177.
- Velez, A., Alifa, E., Azuaje, O., 1990. Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic tropical scallop, *Pecten ziczac*. *Aquaculture* 84, 307–313.
- Vila, M., Giacobbe, M.G., Masó, M., Gangemi, E., Penna, A., Sampedro, N., Azzaro, F., Camp, J., Galluzzi, L., 2005. A comparative study on recurrent blooms of *Alexandrium minutum* in two Mediterranean coastal areas. *Harmful algae*. 4, 673–695.
- Ward, J.E., Shumway, S.E., 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 300, 83–130.
- Wikfors, G.H., Smolowitz, R.M., 1993. Detrimental effects of a *Prorocentrum* isolate upon hard clams and bay scallops in laboratory feeding studies. In Smayda, T.J., Shimizu, Y., eds., *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea.*, pp. 447–452.

- Wikfors, G.H., Smolowitz, R.M., 1995. Experimental and histological studies of four lifehistory stages of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to a cultured strain of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Biological Bulletin* 188, 313–328.
- Wildish, D., Lassus, P., Martin, J., Saulnier, A., Bardouil, M., 1998. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium sp.*, on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 11, 35–43.
- Wilson, R., Reuter, P., Wahl, M., 2005. Muscling in on mussels: new insights into bivalve behaviour using vertebrate remote sensing technology. *Mar. Biol.* 147, 1165–1172.
- Xue, Q.G., 1998. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale.
- Yan, T., Zhou, M., Fu, M., Wang, Y., Yu, R., Li, J., 2001. Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop, *Chlamys farreri*, associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Toxicon.* 39, 1239–1244.
- Yan, T., Zhou, M.J., Fu, M., Yu, R.C., Wang, Y.F., Li, J., 2003. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on early development of the scallop *Argopecten irradians concentricus*. *Aquaculture.* 217, 167–178.
- Yurchenko, O.V., Radashevsky, V.I., Hsieh, H.L., Reunov, A.A., 2009. Ultrastructural comparison of the spermatozoa of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* inhabiting polluted and relatively clean areas in Taiwan. *Aquat. Ecol.* 43, 513–519.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Marigomez, I., 2007. Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. *Aquat. Toxicol.* 81, 183–196.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M., Marigomez, I., 2008. Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation between a relatively unpolluted and a chronically metal-polluted site. *Environ. Pollut.* 156, 367–379.

---

# Glossaire

---

- allélopathie : ensemble de plusieurs interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives, d'une plante sur une autre (phytoplancton inclus).
- atrophie : diminution de volume ou de taille, plus ou moins importante d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule.
- bio-transformation : conversion d'une molécule en métabolites par des processus biologiques. Ces processus peuvent permettre de diminuer la toxicité de certains polluants par la réduction de l'élément et/ou par son incorporation à des composants organiques.
- canaux sodium : canaux ioniques spécifiques aux ions sodium. Dans le cas des cellules nerveuses, les canaux sodium sont à l'origine du potentiel d'action, responsable de la dépolarisation du neurone et de la propagation du signal nerveux.
- chaîne alimentaire (ou trophique) : ensemble d'êtres vivants de différents niveaux trophiques dans lequel chacun consomme des organismes de niveau trophique inférieur dans le but d'acquérir de l'énergie.
- cytométrie en flux : technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules (cellules, bactéries,...) en suspension dans un liquide.
- cytotoxique : propriété d'un agent chimique ou biologique capable d'altérer des cellules, voire de les détruire.
- dégénérescence hyaline : affection dans laquelle les tissus sont progressivement remplacés par une substance hyaline anormale, vitreuse et inerte.
- dépuración/détoxification : élimination des toxines et/ou molécules toxiques présentes dans l'organisme.
- diapédèse hémocytaire : passage des hémocytes entre les cellules de l'épithélium, depuis le tissu conjonctif vers la lumière de l'estomac ou de l'intestin.
- efflorescence (bloom en anglais) : augmentation relativement rapide de la concentration d'une ou plusieurs espèces de phytoplancton dans un système aquatique. Cette augmentation de concentration se traduit généralement par une coloration de l'eau. Ce phénomène peut concerner les eaux douces ou marines.
- endosymbiose : coopération mutuellement bénéfique entre deux organismes vivants (forme de symbiose) où l'un des organismes est contenu par l'autre.
- follicules gonadiques : agrégats de cellules germinales dont l'ensemble forme la gonade.

- hémocyte : cellule circulante des invertébrés présente dans l'hémolymphe et remplissant plusieurs fonctions, dont des fonctions immunitaires (équivalent des cellules sanguines chez les vertébrés).
- hémolymphe : équivalent du sang chez les invertébrés (liquide circulant).
- hyaline : substance vitreuse, homogène, non fibrillaire, colorée en rose pâle par l'éosine, résultant de la dégénérescence du collagène.
- hypnozygote : zygote à la paroi épaisse, qui germe après une période de dormance (zygote : cellule diploïde résultant de la réunion de deux gamètes haploïdes par le processus de fécondation).
- hypoxie / anoxie : diminution ou absence d'oxygène dissous et biodisponible dans un milieu.
- ichtyotoxine : substance toxique affectant les poissons.
- lipides : molécules hydrophobes principalement constituées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène et ayant une densité inférieure à celle de l'eau. Ils constituent la « matière grasse » des êtres vivants.
- néoplasie : tumeur ou croissance anormale de nouveaux tissus.
- phycotoxines : toxines produites par le phytoplancton.
- phytoplancton (ou micro-algues) : organismes unicellulaires photosynthétiques.
- plancton : ensemble des organismes vivant en suspension dans les eaux douces, saumâtres et salées, et subissant les mouvements des masses d'eau.
- ploïdie : la ploïdie d'une cellule caractérise le nombre d'exemplaires de ses chromosomes (diploïde : deux chromosomes ; triploïde : trois chromosomes).
- protistes : groupe constitué de divers micro-organismes eucaryotes.
- réseau trophique : ensemble de chaînes alimentaires reliées entre elles au sein d'un écosystème et par lesquelles l'énergie et la matière circulent.
- thèque/frustule : structure extracellulaire rigide présente chez certaines espèces de phytoplancton et permettant de protéger la cellule. Le terme thèque est généralement employé pour les dinoflagellés (constituée de cellulose) alors que le terme frustule est généralement employé pour les diatomées (constituée de silice).
- valvomètre : appareil utilisé pour enregistrer l'activité valvaire des huîtres.



---

# Liste des abréviations

---

ADN : acide désoxyribonucléique  
ANOVA : analyse de variance  
ARN : acide ribonucléique  
ASP : amnesic shellfish poisoning  
ATP : adénosine triphosphate  
CAEP : ceramide aminoethylphosphonate  
CL : cardiolipin  
DAG : diacideglycérol  
DG : diglycéride  
DSP : diarrhéique shellfish poisoning  
EMSF (SFSW) : eau de mer stérile filtrée (steril filtered sea water)  
FAO : Food and Agriculture Organization  
FCM : flow cytometer  
FSC : forward scatter  
GTX : gonyautoxine  
HAB : harmful algal bloom  
HPLC : high performance liquid chromatography  
HPTLC : high performance thin layer chromatography  
LPC : lysophosphatidylcholine  
MAG : monoacideglycérol  
MG : monoglycéride  
NSP : neurotoxic shellfish poisoning  
OA : okadaic acid  
PC : phosphatidylcholine  
PE : phosphatidylethanolamine  
PI : phosphatidylinositol

PL : phospholipide

PO : phénoloxydase

PS : phosphatidylsérine

PSP : paralytic shellfish poisoning

PSTs : paralytic shellfish toxins

REPHY : RÉseau de surveillance des PHYcotoxines

ROS : reactive oxygen species

SFG : scop for growth

SSC : side scatter

STX : saxitoxine

---

# Table des illustrations

---

## Figures

Figure 1 – Localisation des phénomènes de contamination par des PSP dans le monde rapportés en 2006 (source : <a href="http://www.whoi.edu/redtide/page.do?pid=14899">http://www.whoi.edu/redtide/page.do?pid=14899</a> ). ....	26
Figure 2 – Schéma de l'arbre phylogénétique consensus des Eucaryotes basé sur l'analyse des gènes codant la HSP70, l' $\alpha$ -tubuline, la $\beta$ -tubuline ainsi que sur des gènes ribosomiaux codant la petite et la grande sous unité du ribosome, mis à jour par Sandra Baldauf. Les séquences environnementales découvertes par ciPCR sont illustrées par des pointillés (Baldauf, 2003). ....	37
Figure 3 – Schéma récapitulatif représentant une des hypothèses des événements de l'endosymbiose expliquant la formation des plastes (Delwiche, 1999). ....	38
Figure 4 – Constitution d' <i>Alexandrium minutum</i> .....	39
Figure 5 – Cycle de reproduction d' <i>Alexandrium minutum</i> .....	42
Figure 6 – Anatomie générale d'une huître dans sa valve gauche. Les axes orientaux de l'animal sont indiqués en caractère gras et en italique. (adapté par Delaporte, 2005, d'après Gatsoff, 1964 ; exemple <i>C. virginica</i> ). ....	44
Figure 7 – Schéma résumant la procédure d'exposition de cultures d' <i>A. minutum</i> à des stress mécaniques et thermiques. ....	52
Figure 8 – Schéma résumant la procédure d'exposition de cultures d' <i>A. minutum</i> à des stress chimiques. ....	53
Figure 9 – Schéma résumant la procédure d'exposition de cultures d' <i>A. minutum</i> à une simulation de conditions expérimentales. ....	54
Figure 10 – Schéma résumant la procédure de marquage des cellules d' <i>A. minutum</i> avant analyse par cytométrie en flux. ....	55
Figure 11 – Schéma résumant la procédure de la première expérimentation de suivi de l'activité valvaire de <i>C. gigas</i> en présence d' <i>A. minutum</i> . ....	59
Figure 12 – Schéma résumant la procédure de la deuxième expérimentation de suivi de l'activité valvaire de <i>C. gigas</i> en présence d' <i>A. minutum</i> . ....	59
Figure 13 – Schéma résumant la procédure de la troisième expérimentation de suivi de l'activité valvaire de <i>C. gigas</i> en présence d' <i>A. minutum</i> ( <i>A.m.</i> ). ....	60
Figure 14 – Schéma résumant le plan d'échantillonnage ainsi que les analyses effectuées au terme de l'exposition de <i>C. gigas</i> à <i>A. minutum</i> lors des deux premières expérimentations. ....	62
Figure 15 – Schéma résumant le plan d'échantillonnage ainsi que les analyses effectuées au terme de l'exposition de <i>C. gigas</i> à <i>A. minutum</i> lors de la troisième expérimentation. ....	63
Figure 16 – Schéma résumant les analyses effectuées sur la glande digestive. ....	64
Figure 17 – Schéma résumant les paramètres hématocytaires et humoraux analysés. ....	65
Figure 18 – Schéma résumant les paramètres analysés sur les spermatozoïdes. ....	67

## Tableaux

Tableau 1 – Récapitulatif des contaminations de coquillages par des PSP relevées par le REPHY de 1992 à 2009. ....	26
Tableau 2 : Récapitulatif des efflorescences de différentes espèces d' <i>Alexandrium</i> au niveau du littoral français (métropolitain), relevées par le REPHY entre 1992 et 2009, limitées aux efflorescences qui dépassent 100 000 cellules par litre d'eau de mer. ....	40
Tableau 3 – Récapitulatif des variables indépendantes lors des deux premières expérimentations.....	61
Tableau 4 – Récapitulatif des variables indépendantes lors de la troisième expérimentation.....	61







# Valorisation scientifique

## Publications

Stachowski-Haberkorn, S., Beker, B., Marie, D., **Haberkorn, H.**, Coroller, L. & de la Broise, D. 2008. Roundup can impact the marine microbial community, as shown by in situ microcosm experiment. **Aquatic Toxicology** 89:232-241

Stachowski-Haberkorn, S., Quiniou, L., Beker, B., **Haberkorn, H.**, Marie, D. & de la Broise, D. 2009. Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on microbial communities. **Ecotoxicology** 18:364-376

Tran, D., **Haberkorn, H.**, Soudant, P., Ciret, P. & Massabau, J-C. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. **Aquaculture** 298:338-335

**Haberkorn, H.**, Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E., Lassus, P. & Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology** 97:96-108

**Haberkorn, H.**, Lambert, C., Le Goïc, N., Moal, J., Suquet, M., Guéguen, M., Sunila, I. & Soudant, P., 2010 Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. **Harmful Algae**. 9:427-439.

**Haberkorn, H.**, Tran, D., Massabau, J-C., Ciret, P., Savar, V. & Soudant, P., 2011. Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, exposed to *Alexandrium minutum*. **Marine Pollution Bulletin**. In press.

**Haberkorn, H.**, Hégaret, H., Marie, D., Lambert, C., & Soudant, P. Flow cytometric measurements of cellular responses in a toxic dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, upon exposure to thermal, chemical and mechanical stresses. **Harmful Algae**. In press.

## Communications orales

Effects of *Alexandrium minutum* exposure on physiological and haemocyte parameters of the oyster, *Crassostrea gigas*. **H. Haberkorn**, C. Lambert, N. Le Goïc, A. Le Long, P. Lassus & P. Soudant. **National Shellfish Association**. 2008. Providence (RI-USA).

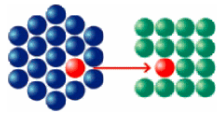
Impact of *Alexandrium minutum* exposure on shell valve activities of the oyster, *Crassostrea gigas*. **H. Haberkorn**, D. Tran, J-C. Massabau, P. Ciret & P. Soudant. **Benthic Ecology Meeting**. 2008. Providence (RI-USA).

Changes in shell-valve activities of *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. **H. Haberkorn**, D. Tran, J-C. Massabau, P. Ciret & P. Soudant. **Physiomar**. 2008. Brest (France).

## Poster

Changes in digestive-gland lipid classes in diploid and triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following *Alexandrium minutum* challenge. **H. Haberkorn**, C. Lambert, N. Le Goïc, A. Lelong, J. Moal, I. Sunila, M. Gueguen, & P. Soudant. **ICMSS 2009**. Nantes (France).





Association Bernard Gregory  
www.abg.asso.fr



*Valorisation des compétences  
«un nouveau chapitre de la thèse®»*

**Hansy HABERKORN**

*Ecole Doctorale des Sciences de la Mer*

*Université de Bretagne Occidentale*

*Nom du "mentor" : Yanyis WESSELS*

## **Impact d'une micro-algue toxique sur la physiologie de l'huître : approche intégrative**



*Sujet académique de la thèse : Impact de la micro-algue toxique, Alexandrium minutum, sur la physiologie de l'huître creuse, Crassostrea gigas : approche intégrative.*

*Nom du directeur de thèse : Philippe SOUDANT*

*Date probable de soutenance : décembre 2009*

<b>1. Cadre général et enjeux de la thèse.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Présentation succincte .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Enjeux scientifiques, économiques .....	2
1.1.2. Court résumé de la thèse.....	3
<b>1.2. La thèse dans son contexte .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Place de la thèse dans le projet global de l'équipe.....	3
1.2.2. Situation au regard de la concurrence .....	4
1.2.3. Compétences mises à la disposition du projet.....	4
1.2.4. Appartenance de l'équipe à un (ou à des) réseaux .....	5
<b>1.3. Moi dans ce contexte .....</b>	<b>5</b>
1.3.1. Les raisons de mon choix de faire une thèse .....	5
1.3.2. Mon rôle dans la définition et la programmation du projet .....	5
<b>2. Déroulement, gestion et coût de votre projet .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Préparation et cadrage du projet .....</b>	<b>6</b>
2.1.1. Evaluation des facteurs de succès et de risques.....	6
2.1.2. Choix des partenaires nationaux ou internationaux.....	6
2.1.3. Gestion des aspects contractuels .....	6
<b>2.2. Conduite du projet.....</b>	<b>6</b>
2.2.1. Principales étapes.....	6
2.2.2. Gestion des relations avec les partenaires .....	7
2.2.3. Problèmes rencontrés et solutions apportées.....	7
<b>2.3. Evaluation et prise en charge du coût du projet.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Domaines d'expertise .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Connaissances acquises .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3. Compétences .....</b>	<b>10</b>
<b>3.4. Méthodes de travail, gestion du temps, travail en équipe... ..</b>	<b>11</b>
<b>3.5. Savoir-faire administratifs, organisationnels, linguistiques... ..</b>	<b>11</b>
<b>3.6. Qualités personnelles .....</b>	<b>11</b>
<b>3.7. Construction d'un réseau personnel.....</b>	<b>11</b>
<b>3.8. Transférabilité de ces compétences.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Résultats, impact de la thèse.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Résultats globaux.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Résultats pour moi-même .....</b>	<b>13</b>

# 1. Cadre général et enjeux de la thèse

## 1.1. Présentation succincte

### 1.1.1. Enjeux scientifiques, économiques

Dans tous les milieux aquatiques, des **algues microscopiques** (aussi appelées micro-algues ou phytoplancton) servent de **nourriture** aux coquillages et à de nombreux animaux. Certaines de ces micro-algues peuvent former des **efflorescences**, c'est-à-dire qu'elles se multiplient très rapidement et en quantité très importante pour devenir l'espèce majoritairement présente dans le milieu. De plus, certaines espèces de micro-algues produisent des substances (que l'on appelle **toxines**) qui peuvent être dangereuses pour les autres êtres vivants. Ces micro-algues, qualifiées de **micro-algues toxiques**, sont présentes dans tous les océans et forment parfois des efflorescences.

Les conchyliculteurs élèvent des coquillages (appelés aussi bivalves du fait de leur coquille séparée en deux valves) dans le but de les vendre pour la **consommation humaine**. Certaines espèces de coquillages peuvent aussi être pêchées dans le milieu naturel sans qu'elles ne soient élevées par l'Homme. Les coquillages (et notamment les huîtres) peuvent se **contaminer** en se nourrissant avec des micro-algues qui produisent des **toxines**. Ces toxines (dont certaines sont mortelles) **s'accumulent** dans les coquillages qui peuvent ensuite être **consommés par l'Homme**. C'est pourquoi des interdictions de pêche et de vente sont mises en place lorsque les coquillages sont contaminés avec des toxines. Ces interdictions ont des **conséquences économiques** importantes : elles empêchent, par exemple, les producteurs de coquillages de vendre leurs produits.

Les **toxines** produites par les micro-algues peuvent avoir des **effets négatifs** sur la santé des coquillages. Elles peuvent **affecter des fonctions importantes** de l'organisme comme par exemple le comportement, la respiration, la nutrition, le système immunitaire (les cellules qui défendent l'organisme) ou encore la reproduction. C'est pourquoi mon travail de thèse a consisté à étudier l'impact d'une micro-algue toxique sur la santé de l'huître creuse : la France est au premier rang de la production Européenne d'huîtres creuses et c'est cette huître que l'on trouve la plupart du temps sur l'étal des poissonniers !

Les efflorescences de micro-algues toxiques ont un **impact économique** important car elles peuvent provoquer des **mortalités** dans les élevages ou les stock naturels (poissons, coquillages,...), mais aussi contaminer les coquillages qui ne peuvent plus être commercialisés. En effet, les toxines accumulées dans les coquillages peuvent être dangereuses pour la **santé humaine**, voir mortelles.

Les coquillages sont capables **d'éliminer** plus ou moins rapidement les **toxines** qu'ils ont accumulées : on appelle ce phénomène la **détoxification**. La vitesse à laquelle se produit cette détoxification dépend notamment de **l'état de santé** du coquillage contaminé. Les connaissances acquises au cours de mon travail de thèse permettent de mieux comprendre l'effet des micro-algues toxiques sur la santé des bivalves (et donc sur leur capacité à éliminer les toxines). Cela aboutira, à terme, à la mise en point de techniques qui **accélèrent** l'élimination des toxines par les bivalves. Ces techniques pourront permettre aux producteurs de coquillages de remettre plus rapidement en vente leurs produits contaminés par des toxines.

Mon travail de recherche a eu pour objectif de mieux comprendre **l'impact des toxines** produites par certaines espèces de phytoplancton sur la **biologie des bivalves**. D'une façon générale, **les effets et les mécanismes d'actions** des micro-algues toxiques sur les autres organismes marins sont très **mal connus et peu étudiés**. Pour cela, un couple micro-algue toxique / bivalve a été choisi (par le laboratoire qui a déposé le projet à l'ANR) en fonction de sa **représentativité** : l'espèce *Alexandrium minutum* (*A. minutum*) a été choisie comme modèle de micro-algue toxique car elle forme des **efflorescences** sur les côtes françaises. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, a été choisie comme modèle de bivalve car elle représente **une part importante** de la production conchylicole nationale. De plus, il arrive souvent que les zones d'élevage des huîtres **coïncident** avec les zones de présence d'*A. minutum*.

### 1.1.2. Court résumé de la thèse

Mon travail de thèse a consisté à étudier l'impact d'une micro-algue toxique sur la santé de l'huître creuse. Le but de ce travail a été de comprendre en quoi une micro-algue produisant des toxines (qui peuvent affecter les humains) peut avoir une incidence sur la santé de l'huître. Les études réalisées peuvent être regroupées en **quatre étapes**, qui correspondent chacune à un « type » une démarche expérimentale :

- (1) déterminer l'**état de santé** des cultures des micro-algues toxiques,
- (2) analyser le **comportement** de l'huître en présence des micro-algues,
- (3) l'impact sur le **système digestif** et le **système immunitaire** et enfin,
- (4) l'influence sur la **reproduction**.

Habituellement, les travaux de recherche étudiant les interactions micro-algues / bivalves s'intéressent à un mécanisme (accumulations des toxines,...) ou à un niveau particulier de la biologie des bivalves (comportement, système immunitaire,...). L'originalité de ce projet était d'avoir une **approche intégrative** de l'interaction entre les bivalves et les micro-algues toxiques, c'est-à-dire d'**intégrer** plusieurs niveaux de la biologie de ce couple (animal entier, organe, tissu, cellule, molécule).

La première étape de mon travail de thèse a consisté à déterminer l'état de **santé des cultures** de micro-algues toxiques, utilisées par la suite pour contaminer les huîtres. En effet l'état de santé des micro-algues a une influence sur la **contamination** des coquillages. J'ai entièrement réalisé cette première approche en utilisant comme outil d'analyse cellulaire la cytométrie en flux.

Dans une seconde étape, nous nous sommes intéressés au **comportement** de l'huître en enregistrant l'activité de ses valves. Cela nous a permis d'étudier la « réaction » des huîtres à la présence d'algues toxiques dans l'eau (dans leur nourriture). Concernant cette étape, le prêt de l'appareil utilisé (valvomètre) et le traitement des données (auquel j'ai été formé) ont été réalisés par un autre laboratoire dans le cadre d'une collaboration et j'ai entièrement réalisé le système expérimental et mené les expérimentations.

Lors d'une troisième étape, nous nous sommes intéressés au **système digestif** de l'huître en l'observant directement sur des préparations au microscope (histologie), mais aussi en étudiant deux grands groupes de lipides (composants de l'organisme qualifiés de « graisses ») qui constituent les réserves des coquillages et les membranes cellulaires. Nous nous sommes aussi intéressés aux hémocytes, qui sont les cellules du **système immunitaire** (système de défense de l'organisme) chez les coquillages : ils sont l'équivalent des globules blancs des mammifères. Lors de ces expérimentations, j'ai entièrement réalisé le système expérimental et mené les expérimentations, et les analyses effectuées ont nécessité la participation de nombreux intervenants (stagiaires, techniciens, ingénieurs et chercheurs) afin de répartir l'importante charge de travail.

Dans une quatrième étape, je me suis intéressé à la **reproduction** de l'huître en étudiant la qualité des gamètes, des embryons et des larves produites par les huîtres après exposition à des micro-algues toxiques.

## 1.2. La thèse dans son contexte

---

### 1.2.1. Place de la thèse dans le projet global de l'équipe

J'ai réalisé ma thèse au **Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin** (LEMAR), hébergé à l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) et rattaché à l'Université de Bretagne Occidentale (UBO). Ce laboratoire est une Unité Mixte de Recherche (UMR) qui comporte à la fois des enseignant-chercheurs et des chercheurs appartenant au CNRS.

L'équipe à laquelle j'étais rattaché (équipe 3 du LEMAR qui en compte 5 au total) s'intéresse aux **problématiques liées à la réponse des organismes et des populations** (ensembles des organismes) aux variations de leur environnement. Cette équipe a pour objectif d'étudier de quelle manière et avec quelle intensité, la variabilité des facteurs environnementaux contribue à moduler la réponse des organismes. Ces réponses sont analysées à différents **niveaux d'intégration**, à l'échelle de la molécule, de la cellule mais aussi au niveau de l'organisme et de la population.

Ma thèse s'est inscrite dans le Thème 1 « interactions entre espèces », Axe 2 « Impact des efflorescences toxiques sur la physiologie des invertébrés » de l'équipe 3. L'objectif général de cette action de recherche est **d'évaluer** comment les efflorescences de **micro-algues toxiques** peuvent **affecter la physiologie des bivalves** et celle de leurs consommateurs, **directement ou indirectement, en combinaison** ou non avec d'autres **stress environnementaux**.

Ma thèse a coïncidé avec un programme de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) intitulé : **Modélisation des mécanismes de contamination des coquillages par des phycotoxines** (MODECOPHY). Avec mon directeur de thèse nous avons fait partie des collaborateurs de ce projet qui a été initialisé par le Laboratoire Phycotoxines du Centre IFREMER de Nantes. La majeure partie des travaux effectués lors de ma thèse a été réalisée dans le cadre de ce projet.

### 1.2.2. Situation au regard de la concurrence

Au niveau national, **peu de laboratoires** s'intéressent à l'**impact** du phytoplancton toxique sur les autres organismes marins (comme par exemple les coquillages). Par contre, l'intérêt des équipes de recherche est plus poussé au niveau international, notamment dans des pays tels que la Norvège, les Etats-Unis, l'Australie,.... Le projet que j'ai mis en place avec l'aide de mon directeur de thèse est original car il **rassemble des approches différentes** autour d'une même problématique (contrairement à l'approche classique qui s'intéresse à un phénomène ou aspect particulier). Je me suis intéressé d'une part à la physiologie de la micro-algue choisie pour exposer les bivalves, et d'autre part à la biologie des huîtres **à différents niveaux**:

- l'organisme en entier : comportement valvaire,
- certains organes : gonades, glande digestive
- certains types cellulaires : hémocytes, gamètes

La thématique **émergente** du phytoplancton toxique est de plus en plus l'objet d'intérêts en biologie marine, que ce soit au niveau de la recherche fondamentale (physiologie des micro-algues, production des toxines,...) ou appliquée (méthodes de décontamination des coquillages, production de molécules d'intérêt par les micro-algues...).

### 1.2.3. Compétences mises à la disposition du projet

Au niveau du laboratoire, j'ai pu bénéficier des installations et matériels suivants :

- **cytomètres en flux** : la cytométrie en flux a été un outil assez transversal dans mon travail de thèse, car elle permet l'analyse de nombreux types cellulaires. Cette technique m'a permis d'étudier aussi bien les micro-algues, les hémocytes que les gamètes.
- **salles climatisées** : j'avais à ma disposition deux salles climatisées (à partager avec d'autres utilisateurs) l'une pour les cultures de micro-algues, et l'autre pour les expérimentations avec les coquillages. Chaque salle possède des arrivées d'air et d'eau de mer, des étagères et des paillasse, mais aucun système expérimental (bacs, réservoirs, pompes,...).
- **microscope inversé à epi-fluorescence** : la microscopie a eu une double utilité au cours de mon travail de thèse. D'une part cela m'a permis d'observer les tissus des coquillages et d'autre part de compléter les analyses cellulaires effectuées par cytométrie en flux.
- **matériel d'histologie** (carrousel, microtome, distributeur de paraffine) : le matériel d'histologie permet de préparer différents tissus (organes) des coquillages, afin de les observer au moyen d'un microscope.
- **valvomètre** : une équipe du laboratoire Environnement et Paléoenvironnement OCéanique (EPOC - Arcachon) a mis à ma disposition des valvomètres. Cet équipement permet d'enregistrer en continu l'activité des valves des coquillages, avec un pas de temps très court (une donnée toutes les 100 ms) et sur plusieurs individus simultanément.
- **Analyse des lipides** : une équipe du laboratoire Physiologie des Invertébrés (IFREMER de Brest) a mis à ma disposition le matériel nécessaire à l'analyse des lipides par chromatographie sur couche mince : petit matériel, déposeur d'échantillon (camag), scanner de plaques, logiciel d'analyse.
- **matériel commun et petit matériel** : j'avais aussi à ma disposition des équipements communs et « classiques » de laboratoire (centrifugeuses, autoclaves, étuves thermostatées,...), ainsi que du petit matériel (consommables, pipettes, ...).

J'ai aussi bénéficié des compétences scientifiques concernant l'utilisation du cytomètre en flux, des techniques d'analyses biochimiques et la préparation des tissus de coquillages en histologie.

L'analyse des échantillons et des données acquises au cours des différentes expérimentations réalisées dans ce projet a nécessité des intervenants extérieurs au laboratoire :

- les **analyses des toxines** ont été réalisées par le laboratoire Phycotoxines du centre IFREMER de Nantes et celles des **lipides** avec l'aide du laboratoire de Physiologie des Invertébrés du centre Ifremer de Brest.
- les connaissances en **histo-pathologie** ont été acquises dans le cadre d'une collaboration avec une spécialiste travaillant dans un laboratoire de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA – l'équivalent d'IFREMER) aux Etats-Unis (Milford – Connecticut) et que j'ai rencontrée lors de mon stage de 2 mois effectué lors de ma 2<sup>ème</sup> année de thèse.
- la **mise à disposition du matériel et l'analyse des données** de valvométrie ont été effectuées en collaboration avec une équipe du laboratoire EPOC de la Station Biologique d'Arcachon.



#### 1.2.4. Appartenance de l'équipe à un (ou à des) réseaux

Au cours de ma thèse, j'ai été amené à collaborer principalement avec quatre laboratoires :

- Physiologie des Invertébrés du centre Ifremer de Brest pour les analyses de lipides
- Phycotoxines du Centre Ifremer de Nantes qui était coordonnateur du projet financé par l'ANR
- l'équipe Géochimie et Ecotoxicologie des Métaux dans les systèmes Aquatiques (GEMA) du laboratoire EPOC (Arcachon) pour l'étude du comportement valvaire
- un laboratoire de la NOAA aux Etats-Unis dans lequel j'ai effectué un stage de 2 mois

### 1.3. Moi dans ce contexte

---

#### 1.3.1. Les raisons de mon choix de faire une thèse

J'ai développé un intérêt pour les **milieux aquatiques** et ses « habitants » lors de mes études universitaires. C'est au cours de mes différents **stages et expériences professionnelles** (j'ai notamment occupé un poste de technicien dans une éclosérie de coquilles St-Jacques entre la fin de mon DEA et le début de la thèse) que je me suis intéressé aux bivalves, à leur biologie et aux interactions avec leur environnement. Cela m'a naturellement conduit à m'intéresser à la problématique liée au phytoplancton **toxique** et à son **impact** sur les coquillages.

La thématique « interaction phytoplancton toxique / bivalves » a été initiée au LEMAR (laboratoire dans lequel j'ai effectué mon DEA et ma thèse) par une étudiante au travers d'une collaboration, peu de temps avant mon DEA.

C'est lors de mon stage de DEA que j'ai rencontré mon directeur de thèse qui, bien qu'il n'était pas mon encadrant direct pour mon DEA, faisait partie de l'équipe dans laquelle j'ai effectué mon stage. C'est à la suite d'échanges scientifiques que nous avons décidé **d'élaborer et de soumettre** à la Région Bretagne **une demande de financement de thèse** sur cette thématique, sous la forme d'une Allocation de Recherche pour les Etudes Doctorales (ARED). Le financement obtenu, j'ai pu démarrer mon projet de thèse intitulé : Effets des micro-algues toxiques sur la biologie des bivalves. Le titre officiel de mon manuscrit de thèse étant : Impact d'*Alexandrium minutum* sur la physiologie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : une approche intégrative.

#### 1.3.2. Mon rôle dans la définition et la programmation du projet

**J'ai élaboré et rédigé** avec l'aide de mon directeur de thèse mon **projet de thèse** ainsi que la **demande de financement** à la Région Bretagne. Un petit **réseau de connaissances**, mis en place lors d'un précédent stage (DU – 2004) au niveau de Comités Locaux et Régionaux des Pêches, a permis de **soutenir cette demande** qui a abouti.

Concernant le déroulement et la programmation du projet, j'ai pris toutes les **décisions importantes** (orientation, programmation,...) après avoir consulté mon directeur de thèse. Notre implication dans le projet ANR n'a pas été une contrainte par rapport à mon travail de thèse car la thématique, les questions posées et les démarches mises en place correspondaient parfaitement au cadre de mon sujet de thèse et à mes attentes en terme de travail de recherche.

## 2. Déroulement, gestion et coût de votre projet

### 2.1. Préparation et cadrage du projet

#### 2.1.1. Evaluation des facteurs de succès et de risques

Le principal risque de ce projet était lié au **choix des modèles biologiques** pour les expérimentations, que ce soit la micro-algue toxique ou le bivalve. En effet, tous les organismes ne **réagissent** pas de la même façon aux **conditions artificielles** du laboratoire, et certains **peuvent ne pas s'y adapter**. Dans ce cas, les solutions envisageables auraient été de changer de couple micro-algue toxique / bivalve ou de modifier / repenser les systèmes expérimentaux que j'avais mis en place, afin de mieux répondre aux besoins des organismes. De même, nous ne savions pas à l'avance si les **marqueurs biologiques**, que j'ai choisis avec mon directeur de thèse pour **évaluer l'impact** des micro-algues toxiques sur les bivalves, étaient les plus **pertinents**. Dans le cas contraire, nous aurions pu choisir une **autre approche** ou d'**autres marqueurs** pour caractériser cette interaction.

Dans tous les cas, l'étendue des possibilités liées à mon sujet de thèse, des moyens potentiellement mis à ma disposition et l'étendue des connaissances qu'il reste à acquérir dans cette thématique (interactions micro-algues toxiques / bivalves) m'auraient éventuellement permis de réorienter relativement facilement mon travail de recherche.

#### 2.1.2. Choix des partenaires nationaux ou internationaux

Mon directeur de thèse m'a guidé dans le **choix des partenaires** à partir du réseau de connaissances qu'il avait précédemment établi. Au niveau national, j'ai essentiellement collaboré avec deux laboratoires d'**IFREMER** (Laboratoire Phycotoxines du Centre de Nantes et le Laboratoire de Physiologie des Invertébrés du Centre de Brest), mais aussi avec une **autre UMR** (équipe GEMA du laboratoire EPOC à Arcachon) rattachée à l'Université de Bordeaux. Ces trois partenaires ont été intégrés dans mon travail de thèse de par leurs compétences scientifiques et techniques. Sur le plan **international**, j'ai eu l'occasion au cours de ma thèse d'effectuer un stage de 2 mois aux **Etats-Unis** dans un laboratoire (Milford Laboratory) de la **NOAA**.

#### 2.1.3. Gestion des aspects contractuels

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la **mobilisation de financements** externes à l'équipe. Tout d'abord, j'ai pleinement participé à **l'élaboration et à la rédaction** d'une demande de **financement de thèse** auprès de la Région Bretagne, qui a été obtenue. J'ai aussi **rédigé** deux demandes de financements pour des **déplacements** à l'étranger (colloque et stage) auprès de l'IUEM et de la Région Bretagne.

### 2.2. Conduite du projet

#### 2.2.1. Principales étapes

La recherche de données bibliographiques, l'analyse et le traitement des données acquises (analyses statistiques) lors des différentes expérimentations ainsi que l'activité de communication écrite et orale (rapports, publications, correction des rapports des stagiaires encadrés, présentations orales, thèse) ont été présents tout au long de ce travail de thèse.

La majeure partie du temps de ma thèse a été consacrée aux expérimentations et à l'analyse des échantillons obtenus et peut être répartie en 5 activités principales :

- **Cytométrie en flux** : la cytométrie en flux s'est avérée être un outil transversal dans mon travail de thèse puisque son application concernait aussi bien les huîtres que les micro-algues.
- **Suivi terrain** : en marge de mon travail de thèse j'ai participé à la préparation et l'analyse de coquillages (moules) collectés dans le cadre d'un suivi de contamination par des micro-algues toxiques en milieu naturel.
- **Expérimentations** : j'ai assuré la mise en place et le fonctionnement des systèmes expérimentaux, ce qui nécessitait que je gère en parallèle les cultures de micro-algues et les coquillages (suivi quotidien).
- **Histologie** : j'ai participé à la préparation des tissus prélevés lors des expérimentations (histologie) et j'ai entièrement réalisé l'observation et l'interprétation des résultats (microscopie).
- **Analyses biochimiques** : j'ai participé à l'analyse des échantillons issus des expérimentations (contenu en protéines, activité enzymatique, contenu en lipides).

Mon stage aux Etats-Unis a eu lieu en mars et avril 2008 dans un laboratoire de la NOAA. Dans ce cadre, j'ai effectué des expérimentations d'interaction micro-algues toxiques / bivalves (embryons et larves), acquis des compétences en histologie et participé à **deux colloques** lors desquels j'ai présenté des résultats de mes travaux (deux communications orales en anglais).

	2006	2007	2008	2009
		1ère année	2ème année	3ème année
bibliographie, analyse/traitement données, rédaction				
cytométrie en flux				
suivi terrain				
experimentations				
histologie				
analyses biochimiques				
stage EU				

La mise en place d'un **comité de thèse** (qui rassemble des chercheurs extérieurs au projet qui évaluent le travail de thèse) en fin de première année a permis de **recadrer** le sujet. En effet, mon sujet de thèse étant très large dans sa version définie avec mon directeur de thèse, le nombre de couples micro-algue toxique / bivalve ainsi que les approches et les types d'interactions envisageables étaient assez importants. Après présentation des résultats obtenus au cours de la première année (qui a surtout été exploratoire) et discussion avec le comité de thèse, j'ai décidé avec mon directeur de thèse de recentrer mon sujet sur le couple *A. minutum* / *C. gigas*.

Le **renouvellement annuel du financement** de la Région Bretagne se faisait après acceptation d'un **rapport annuel** d'avancement des travaux, que j'ai rédigé à la fin de chaque année.

Le projet MODECOPHY a fait l'objet d'une réunion tous les 6 mois, avec la participation de notre équipe (mon directeur de thèse, mon directeur scientifique, une technicienne et moi,) et de l'équipe porteuse du projet de l'ANR. Pour chaque réunion avait lieu une présentation orale de l'avancée des travaux (que j'ai réalisée à chaque réunion pour notre équipe). J'ai participé à la rédaction de rapports intermédiaires tous les 6 mois, et de rapports complets tous les ans, concernant notre partie des travaux, pour l'ANR.

Tout au long de ma thèse j'ai eu de **nombreux échanges** avec mon **directeur de thèse** et mon directeur scientifique sur la **mise en place et l'avancée des travaux**, le traitement des données, l'interprétation des résultats et la rédaction de publications, rapports et présentations orales.

### 2.2.2. Gestion des relations avec les partenaires

Après **initiation des collaborations** avec les **partenaires nationaux** (deux laboratoires des Centres IFREMER de Brest et de Nantes, ainsi que l'équipe GEMA du laboratoire EPOC d'Arcachon) et **internationaux** (Milford Laboratory de la NOAA aux Etats-Unis) par mon directeur de thèse, **j'ai entièrement géré** les échanges avec ces partenaires (avec dans certains cas « accord » de mon directeur de thèse).

Concernant les deux laboratoires IFREMER, le partenariat c'est concentré sur **l'analyse d'échantillons** (négociation des quantités, transfert des échantillons et des données). Les expérimentations de comportement des bivalves ont été réalisées en partenariat avec le laboratoire GEMA qui nous a **prêté le matériel et a traité les données**. La conception des expérimentations, l'interprétations des données et la rédaction de publications ont été réalisés en **collaboration** avec eux.

La collaboration avec le laboratoire des Etats-Unis avait été initiée avant ma thèse par mon directeur de thèse. Après que mon directeur de thèse ait demandé au laboratoire de la NOAA s'il avait la possibilité de m'accueillir, j'ai **pris contact** avec un encadrant sur place, **organisé mon séjour** et **défini** (avec l'encadrant sur place) **les objectifs** (expérimentations) de ma venue. J'ai fait coïncider les dates de mon séjour aux Etats-Unis avec le déroulement de deux colloques internationaux, afin de pouvoir y présenter mes travaux.

### 2.2.3. Problèmes rencontrés et solutions apportées

Les principaux problèmes ont été rencontrés lors de la mise en place des **systèmes expérimentaux** d'exposition des huîtres aux micro-algues toxiques, car ils étaient inexistantes au laboratoire. J'ai donc dû **concevoir et réaliser** les systèmes expérimentaux. De plus, le déroulement des expérimentations d'exposition a nécessité que j'effectue un **suivi quotidien** (pour m'assurer du bon fonctionnement du système expérimental et changer les suspensions de micro-algues servant à nourrir les

coquillages), pour des expérimentations pouvant durer jusqu'à un mois.

Une des principales **contraintes** liée à mon travail de thèse a concerné l'entretien des différentes souches de micro-algues (7 au total) utilisées au long de ces 3 années, qui nécessitaient un repiquage toutes les 2 semaines. La plupart des laboratoires utilisant des micro-algues constituent des « souchothèques » (collections de différentes souches) entretenues par un **personnel dédié** (technicien). L'absence d'un tel service dans mon laboratoire d'accueil m'a conduit à assurer l'entretien des souches pour toute la durée du projet. De même, les expérimentations de contamination des huîtres par des micro-algues toxiques ont nécessité la production d'importants volumes de culture, pouvant aller jusqu'à 300 litres. J'ai entièrement pris en charge cet aspect en adaptant le matériel mis à ma disposition aux contraintes de production en masse de micro-algues toxiques.

### 2.3. Evaluation et prise en charge du coût du projet

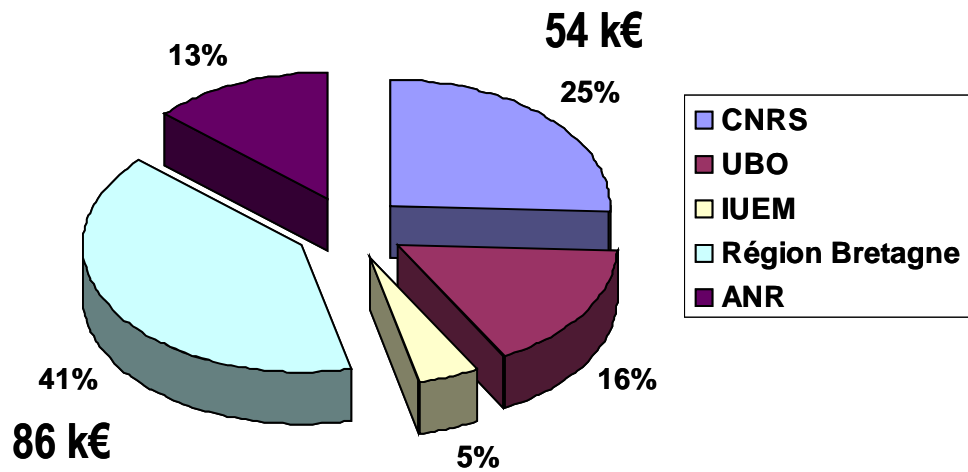
Le coût total de ma thèse s'élève à **205 k€**, réparti à 86% en **Ressources Humaines** (ma bourse de thèse représente 48% des RH) et financé à hauteur de 41% par la **Région Bretagne** (qui a financé la totalité de mon salaire sur trois ans).

		Origine					Total
		Région Bretagne	CNRS	UBO	ANR	IUEM	
Nature	Ressources humaines	85 482 €	54 375 €	26 023 €	10 677 €	<del>1 000 €</del>	176 558 €
	Fonctionnement	600 €	<del>1 000 €</del>	9 000 €	11 650 €	1 000 €	22 250 €
	Investissement	<del>1 000 €</del>	<del>1 000 €</del>	<del>1 000 €</del>	5 900 €	<del>1 000 €</del>	5 900 €
	Total	86 082 €	54 375 €	35 023 €	28 227 €	1 000 €	204 708 €

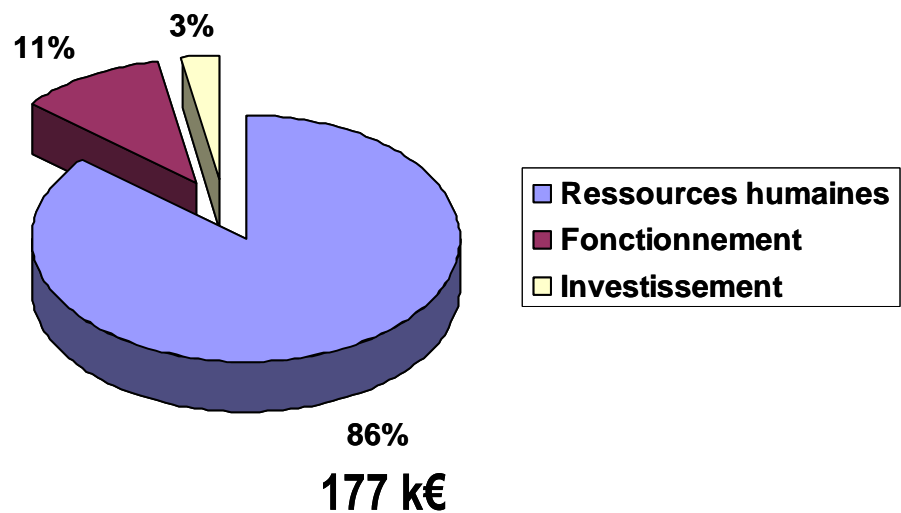
La contribution des différents financeurs du projet de thèse est répartie de la façon suivante :

- **Région Bretagne** : salaire du doctorant (100 %) et bourse pour la participation à un colloque à l'étranger
- **ANR MODECOPHY** : investissement (achat d'un ordinateur portable et participation à l'achat d'un cytomètre en flux), salaire d'une technicienne contractuelle (100 %) et coût de fonctionnement du projet de thèse (hors infrastructure)
- **UBO** : fonctionnement (infrastructure) et salaire du directeur scientifique (10 %)
- **CNRS** : salaire du directeur de thèse (20 %) et d'une technicienne (10 %)
- **IUEM** : bourse de stage à l'étranger (1000€)

## Origines des fonds



## Postes des dépenses



### 3. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

#### 3.1. Domaines d'expertise

La réalisation de mon travail de thèse m'a conduit à développer des compétences scientifiques et techniques pointues dans les domaines suivants :

- **cytométrie en flux** : développement/adaptation de méthodes ; acquisition et traitement des données ; interprétation des résultats.
- **histologie/histopathologie** : dissection et fixation des tissus, préparation et coloration des coupes, observation, photographie et interprétation des lames.
- **analyse des lipides** : extraction à partir d'organes, quantification (chromatographie sur couche mince), analyse des chromatogrammes et interprétation des résultats

#### 3.2. Connaissances acquises

Lors de ma thèse j'ai acquis des connaissances scientifiques et techniques dans les domaines suivants :

- **Laboratoire** : cultures phytoplanctoniques, conception et réalisation de systèmes expérimentaux pouvant accueillir des bivalves, microscopie, biochimie (dosages de protéines, et d'activité enzymatique, tests d'hémolyse).
- **Informatique** : traitement de données (Excel, Sigmaplot, WinCat, WinMDI), analyses statistiques (Statgraphic), rédaction (Word, Lyx), présentations/posters (Powerpoint), base de données bibliographiques (EndNote, Bibteck)
- **Communication** : communication écrite (rapport, synthèse, poster) et orale (présentation) en français et en anglais
- **Encadrement, gestion d'équipe** : encadrement/formation de stagiaires de différents niveaux (DUT, Licence 3, Master 1 et 2), gestion d'équipe (réunion, répartition des tâches, suivi des travaux,...)

#### 3.3. Compétences

##### 3.3.1.a Méthodologiques

De façon générale, mon travail de thèse m'a appris à **mettre en place une démarche** (qu'elle soit scientifique ou technique) pour répondre à une problématique ou une question particulière. **L'approche intégrative** développée lors de ce projet m'a appris à intégrer et à envisager des liens entre les différentes approches mises en place autour d'une même problématique.

Après avoir été formé à la cytométrie en flux par mon directeur de thèse ainsi que par mon directeur scientifique (outil qu'ils utilisent pour étudier les hématocytes), j'ai **adapté** certaines de ces techniques aux micro-algues. Parallèlement, j'ai utilisé un microscope inversé à épi-fluorescence car ces deux techniques s'avèrent être très **complémentaires**. En effet, la lampe à fluorescence qui équipe le microscope permet de **vérifier de façon visuelle** les observations effectuées par cytométrie en flux : le cytomètre permet d'obtenir des données « chiffrées » concernant les cellules alors que le microscope permet de les observer directement.

En l'absence de systèmes expérimentaux adaptés pour pouvoir accueillir et nourrir des bivalves, j'ai donc dû **concevoir** (et adapter en fonction des besoins), **commander** le matériel et **réaliser** ces systèmes.

##### 3.3.1.b Conduite de projet

Certaines des expérimentations réalisées au cours de ma thèse ont nécessité **l'intervention simultanée de plusieurs participants**. J'ai donc du gérer la **répartition** et la **réalisation** des différentes tâches. J'ai aussi **encadré et co-encadré** plusieurs stagiaires **de niveaux différents** (DUT, Licence 3, Master 1 et 2), de la réalisation des travaux à la rédaction du rapport et à la présentation finale.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont fait l'objet d'un **suivi** de la part des **organismes financeurs** : la Région Bretagne et l'ANR. Le financement accordé par la Région a fait l'objet d'un **rapport annuel d'avancement des travaux** rédigé par mes soins. Concernant le financement de l'ANR, l'état d'avancement des travaux faisait l'objet de **réunions annuelles** au cours desquelles je présentais la partie réalisée par notre équipe. De plus, **un rapport** à destination de l'ANR était rédigé, pour lequel je rédigeais la partie de nos travaux.

### 3.3.1.c Communication

J'ai eu l'occasion de participer à **quatre colloques internationaux** (dont deux aux Etats-Unis et deux en France) : pour trois d'entre eux j'ai effectué des **communications orales en anglais** et **un poster en anglais** pour le dernier. J'ai aussi réalisé plusieurs **communications orales** (français) lors de séminaires (réunions d'équipe, présentations de travaux) ou d'état d'avancement des travaux (réunion financement ANR, comité de thèse).

### 3.3.1.d Négociation

Certains aspects des collaborations avec les partenaires du projet ont fait l'objet de **négociations** que j'ai pris en charge après consultation de mon directeur de thèse. Il s'agissait par exemple de négocier le **nombre d'échantillons à analyser** (compromis entre l'intérêt des données acquises et le coût et le temps passé,...) ou encore la **participation aux publications**. J'ai aussi été amené à **négocier des prix** lors de commandes de matériel, consommables et réactifs de laboratoire.

### 3.4. Méthodes de travail, gestion du temps, travail en équipe...

---

La réalisation d'une thèse nécessite une **rigueur** et une **régularité** du travail fourni. Lors de ma thèse j'ai beaucoup **travaillé en équipe** lors de discussions scientifiques, mais surtout lors d'expérimentation importantes en terme de charge de travail, et qui nécessitaient l'intervention de nombreuses personnes. Les **collaborations** mises en place sur la base du réseau de mon directeur de thèse, m'ont permis d'avoir accès à de nombreuses **connaissances** et **compétences** scientifiques et techniques.

### 3.5. Savoir-faire administratifs, organisationnels, linguistiques...

---

Mes travaux de thèse m'ont conduit à prendre en main la **gestion des commandes et des missions** nécessaires à la réalisation de mon travail, ainsi que l'**organisation** de mon stage aux Etats-Unis.

D'un point de vu organisationnel, j'ai été amené à **encadrer** des stagiaires et à **gérer** des expérimentations qui nécessitaient la participations de plusieurs intervenants (mise en place, déroulement, fonctionnement, répartition des tâches,...).

La rédaction de **publications scientifiques**, trois **communications orales** et **un poster**, ainsi qu'un **stage** de deux mois dans un laboratoire aux Etats-Unis m'ont permis de **perfectionner mon anglais**, aussi bien écrit qu'oral.

### 3.6. Qualités personnelles

---

Le côté **stimulant** de la recherche m'a donné envie de me surpasser. J'aime ce qui est **nouveau**, **inconnu**, ce qui demande de la **réflexion**, de l'**innovation**, de la **rigueur** et de la **méthode**. Quelle démarche dois-je mettre en place pour **répondre** à cette question ? Quelles **difficultés/problèmes/contraintes** vais-je rencontrer ? Quelle est la meilleure façon d'y **remédier** (sachant que la solution parfaite n'existe pas) ?

La durée et l'intensité du travail nécessaires à la réalisation de ma thèse m'ont conduit à mettre à l'épreuve ma **persévérance** et mon **engagement**. Je sais aujourd'hui que je suis capable de mener **un travail de longue haleine**, qui demande beaucoup d'**investissement personnel** et de **persévérance**. J'ai aussi appris à **m'adapter** à **différentes situations** et au **changement**, au travers des **échanges** avec les différents partenaires et interlocuteurs, à **remplir mes objectifs** dans un environnement en **perpétuel changement** avec des **contraintes** logistiques, matérielles mais aussi par le fait de travailler avec du matériel biologique, des êtres vivants qui ne font pas toujours ce que l'on veut.

Le travail de thèse m'a permis de renforcer ma **capacité d'intégration** (prise en compte de l'environnement et de paramètres d'une situation pour en tirer des conclusions et apporter des solutions), de **réflexion** (questions posées par ma problématique de thèse et par les résultats trouvés) et de **méthodologie** (mise en place d'une approche intégrative). Je pense avoir développé des facilités pour **créer** et **concevoir**.

J'ai eu l'occasion **d'encadrer** des stagiaires de différents niveaux et de **gérer une équipe** lors d'expérimentations nécessitant la participation de plusieurs intervenants. Mon **adaptabilité** et mon **ouverture d'esprit** font que les échanges avec mes différents collaborateurs se passent bien dans une très grande majorité des cas. La participation à des **réunions**, **colloques** et **discussions de travail**, ainsi que la **rédaction de rapports** et de **publications scientifiques** ont contribué à améliorer mes capacités de **communication** et de **synthèse**.

### 3.7. Construction d'un réseau personnel

---

Certaines des collaborations initialisées dans le cadre de la thèse peuvent constituer des pistes pour ma **vie professionnelle** future. Elles peuvent constituer un **réseau de relations** utiles dans ma future vie scientifique, mais aussi être des **employeurs potentiels**.

Trois des collaborations mises en place lors de ma thèse peuvent potentiellement déboucher sur des contrats de travail (post-doc, CDD, CDI) : Ifremer Nantes, Arcachon et les Etats-Unis.



### ***3.8. Transférabilité de ces compétences***

---

J'ai choisi de classer mes compétences en fonction de leur degré de transférabilité (des plus transférables aux plus spécifiques).

**Compétences larges** : gestion de projet, encadrement, synthèse de données/connaissances, analyses statistiques, rédaction de rapports, communication orale, informatique

**Compétences spécifiques** : cytométrie en flux, systèmes expérimentaux, histologie, analyses biochimiques

**Compétences très spécifiques** : culture de phytoplancton, aquaculture des bivalves

## 4. Résultats, impact de la thèse

### 4.1. Résultats globaux

---

Au niveau de l'équipe et du laboratoire, ce travail de thèse a permis **d'asseoir** la problématique micro-algues toxiques comme un **axe de recherche**. Cela a permis d'introduire et de développer de **nouvelles connaissances** et **compétences techniques**, mais aussi d'initier (GEMA – Arcachon ; IFREMER - Nantes) et de renforcer (IFREMER – Brest ; NOAA – Etats-Unis) des **collaborations** avec d'autres laboratoires.

Mon projet de thèse a permis l'acquisition de **données** et de **connaissances** concernant les interactions entre les micro-algues toxiques et les bivalves. Ces connaissances fondamentales permettent de mieux comprendre l'impact des micro-algues toxiques sur la biologie des bivalves et pourront aider à la **mise au point de méthodes** visant à **accélérer la décontamination** des coquillages. Ces méthodes permettront aux producteurs de coquillages de remettre plus rapidement en vente leurs produits et donc de **limiter leurs pertes économiques**.

### 4.2. Résultats pour moi-même

---

Bien que j'apprécie un **environnement professionnel stable**, le travail de thèse m'a conduit à apprendre à **m'adapter** à des **environnements et des situations différentes** et en **perpétuel changement**. J'apprécie le **travail en équipe** en terme **d'échange et de réflexion**, mais ma rigueur fait que parfois j'ai du mal à **déléguer mon travail** d'un point de vue **technique**. Là encore, **l'encadrement de stagiaires** m'a appris à **déléguer** une partie de mon travail (après avoir formé la personne impliquée). La participation à des **réunions** et des **colloques** (au cours desquels j'ai effectué des présentations orales) m'a appris à **m'exprimer et faire passer mes idées en public**, mais aussi à prendre **confiance en moi**.

En dehors de la **voie « classique »** de mon parcours, c'est-à-dire un poste dans la **recherche publique ou privée** (CNRS, IFREMER, Université,...) en temps que chercheur, enseignant-chercheur ou ingénieur de recherche, **je reste ouvert** aux propositions et opportunités qui se présenteront. Je cherche avant tout un travail qui implique une **stimulation intellectuelle, de la créativité, de la conception, de l'échange et du travail en équipe** (et qui soit en lien, si possible, avec le milieu marin).



# Résumé

Les effets de la micro-algue toxique, *Alexandrium minutum*, sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été analysés par une approche intégrative. Cette démarche a conduit à s'intéresser à différents aspects de la physiologie de l'huître, tels que le comportement, l'activité digestive, des activités cellulaires et la reproduction.

Dans un premier temps, le statut physiologique de *A. minutum* a été abordé en utilisant la cytométrie en flux, la microscopie ainsi que des marqueurs fluorescents. Cela nous a permis de démontrer que certaines conditions expérimentales étaient susceptibles de perturber la physiologie de ce dinoflagellé. Les systèmes expérimentaux permettant d'exposer les huîtres ont donc été conçus afin de limiter les conditions stressantes pour la micro-algue toxique.

Dans un second temps, les huîtres ont été exposées à *A. minutum*, en milieu contrôlé, au cours de plusieurs expérimentations, et comparées à des huîtres témoins nourries avec *Isochrysis galbana* ou *Heterocapsa triquetra*.

L'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* provoque chez les huîtres une réponse comportementale, se traduisant notamment par une augmentation du temps d'ouverture et de la fréquence des micro-fermetures des valves. Une corrélation positive entre le temps d'ouverture des valves et la quantité de toxines accumulées par les huîtres a été observée. De même, des pathologies du muscle adducteur des huîtres ont été constatées, ce qui pourrait expliquer les changements de comportement des huîtres.

Le dinoflagellé toxique induit une activation des mécanismes de défense des huîtres. Ainsi, une augmentation de la production de mucus a été observée au niveau des branchies, de même qu'une importante réaction inflammatoire dans la glande digestive. Les paramètres hémocytaires ont également présenté des variations. Des différences, en terme d'activité de la phenoloxydase et de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les hémocytes, ont été observées entre les huîtres exposées à *A. minutum* et les témoins. Les variations des paramètres hémocytaires semblent liées au stade de maturité des huîtres et à la quantité de toxines accumulées, mais aussi à leur statut métabolique lors de l'exposition.

Les contenus de la glande digestive en lipides sont également modifiés suite à l'exposition à *A. minutum*. Une réduction significative des contenus en monoglycérides (MG) et diglycérides (DG) ainsi qu'une importante diminution du contenu en phosphatidylcholine (PC) ont été observés. La diminution de la PC étant parallèle à celle des MG et DG, cela suggère une diminution de la synthèse des lipides liée à une altération des tissus de la glande digestive.

Finalement, les spermatozoïdes produits par les huîtres exposées à *A. minutum* présentaient une réduction de leur activité (diminution de la mobilité et du contenu en ATP) en comparaison aux huîtres témoins. Cette altération de la physiologie des gamètes pourrait avoir des répercussions sur la reproduction des huîtres.

Etant donné la subtilité de certains changements et l'interconnexion des paramètres mesurés, la mise en place d'une approche intégrative nous a permis d'obtenir une vision holistique de l'interaction *A. minutum* / *C. gigas*. La présente étude a mis en évidence des interactions peu ou mal connues entre des caractères comportementaux, morphologiques et physiologiques des huîtres. Cela nous a conduit de mieux comprendre les interactions entre les micro-algues toxiques et les bivalves, ainsi que les impacts écologiques potentiels.